

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK METANOL DAUN KAMBOJA PUTIH
(*Plumeria acuminata L.*) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI
DAN EKSPRESI *CYCLOOXYGENASE 2 (COX-2)* PADA DUODENUM
TIKUS (*Rattus norvegicus*) *INFLAMMATORY BOWEL DISEASE*
(IBD) HASIL INDUKSI INDOMETASIN**

SKRIPSI

Oleh:
NAVY LINGGAR HANGGAR AMIEN
115130100111063



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH TERAPI EKSTRAK METANOL DAUN KAMBOJA PUTIH
(*Plumeria acuminata* L.) TERHADAP GAMBARAN HISTOPATOLOGI
DAN EKSPRESI *CYCLOOXYGENASE 2* (COX-2) PADA DUODENUM
TIKUS (*Rattus norvegicus*) *INFLAMMATORY BOWEL DISEASE*
(IBD) HASIL INDUKSI INDOMETASIN**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:
NAVY LINGGAR HANGGAR AMIEN
115130100111063



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Terapi Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L.)
Terhadap Gambaran Histopatologi dan Ekspresi *Cyclooxygenase* 2 (Cox-2)
pada Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel
Disease* (IBD) Hasil Induksi Indometasin**

Oleh :
NAVY LINGGAR HANGGAR AMIEN
115130101111063

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 03 Agustus 2018
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I



Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

Pembimbing II



drh. Fajar Shodik Permata, M. Biotech
NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,
Dekan
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya



Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Navy Linggar Hanggar Amien

NIM : 115130100111063

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Terapi Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L.) Terhadap Gambaran Histopatologi dan Ekspresi *Cyclooxygenase 2* (Cox-2) pada Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Hasil Induksi Indometasin.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub diisi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Juli 2018

Yang menyatakan,



Navy Linggar Hanggar Amien

NIM. 115130100111063

Pengaruh Terapi Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L.) Terhadap Gambaran Histopatologi dan Ekspresi *Cyclooxygenase-2* (Cox-2) Pada Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Hasil Induksi Indometasin

ABSTRAK

Inflammatory Bowel Diseases (IBD) is a merupakan inflamasi yang menyerang saluran pencernaan yaitu lambung, usus halus dan kolon. Golongan *Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs* (NSAID) merupakan salah satu penyebab terjadinya keparahan IBD. Ekstrak metanol daun Kamboja putih (*Plumeria acuminata*) yang mengandung lupeol asetat digunakan sebagai antiinflamasi dan antioksidan alami. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata* L) terhadap perubahan histopatologi dan ekspresi *cyclooxygenase-2* (COX-2) organ duodenum pada hewan model tikus IBD. Tikus model IBD dihasilkan dengan cara pemberian indometasin 15 mg/kg BB secara per oral. Penelitian ini menggunakan lima kelompok tikus (*Rattus norvegicus*), yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif (IBD), kelompok terapi dosis 500 mg/kg BB, 750 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB. Pengamatan histopatologi organ duodenum menggunakan mikroskop dan pengukuran ekspresi *cyclooxygenase-2* (COX-2) dilakukan dengan metode *Immunohistokimia* (IHK) dan diukur menggunakan program immunorasio kemudian dianalisis dengan menggunakan tes ANOVA dengan $\alpha = 0,05$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun kamboja putih mampu memperbaiki kerusakan mukosa duodenum serta menurunkan infiltrasi sel radang pada tikus model IBD serta menurunkan persentase area ekspresi COX-2 secara signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan. Kelompok dengan dosis terapi 1000 mg/kg BB adalah dosis efektif menurunkan ekspresi COX-2 sebesar 68,62%. Disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun kamboja putih dapat digunakan sebagai terapi IBD.

Kata kunci : *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), kamboja putih (*Plumeria acuminata* L), Indometasin, infiltrasi sel radang, dan *cyclooxygenase-2* (COX-2).

Therapeutic Effect of Methanolic Extract of *Plumeria acuminata* leaf toward the Expression of Cyclooxygenase-2 (Cox-2) and Duodenal Histopathology on Inflammatory Bowel Disease (IBD) Rats (*Rattus norvegicus*) Induced by Indomethacin

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) is a digestive inflammatory disease that attacks the stomach, small intestine and large intestine. *Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs* (NSAID) group is one of IBD caused. The methanolic extract of *Plumeria acuminata* leaf contain of lupeol acetate used as anti-inflammatory and antioxidant. The purpose of the research was to study the potency of methanolic extract of *Plumeria acuminata* leaf that could repair duodenal histopathology and decrease cyclooxygenase-2 (COX-2) expression on IBD rats. This research used Rats (*Rattus norvegicus*) Wistar strain aged between 8-12 weeks old and had average of 150-200 g of BW. IBD Rats were prepared by administered of 15 mg/kg BW indomethacin, orally. There were five groups of rats used in this research: control group (A); IBD group (B) and three groups with therapy of methanolic extract of *Plumeria acuminata* leaf dose of 500 mg/kg BW (C), 750 mg/kg BW (D) and 1000 mg/kg BW (E). Duodenal Histopathology were observed microscopically and COX-2 expression was observed by immunohistochemistry method and measured by *Imunoratio* software. Data were analyzed with ANOVA test followed by *Honestly Significant Difference* (HSD) test ($\alpha = 0.05$). The result showed that methanolic extract of *Plumeria acuminata* leaf could repair mucosal epithelial duodenal cells from erosion and decrease infiltration of inflammatory cells and also decrease COX-2 expression, significantly ($p < 0.05$). Dose of 1000 mg/kg BW is the best result to decrease COX-2 expression up to 68.62%. The conclusion was *Plumeria acuminata* leaf extract could be used as IBD therapy.

Key words : *Inflammatory Bowel Disease (IBD), Plumeria acuminata, Indomethacin, Infiltration Inflammatory Cell, and cyclooxygenase-2 (COX-2).*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Yang mengatur segala urusan manusia dan atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan SKRIPSI ini. Sholawat dan salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Agung Muhammad SAW.

Skripsi ini merupakan persyaratan terakhir bagi mahasiswa Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya untuk dapat meraih gelar sarjana Strata Satu Kedokteran Hewan (S.KH). Penelitian ini berjudul “Pengaruh Terapi Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata L.*) dan Terhadap Gambaran Histopatologi dan Ekspresi *Cyclooxygenase 2* (Cox-2) Pada Duodenum Tikus (*Rattus norvegicus*) *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Hasil Induksi Indometasin”.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES sebagai Pembimbing I sekaligus sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. drh. Fajar Shodiq Permata, M. Biotech sebagai Pembimbing II yang telah membantu penulis dalam mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
3. Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc. selaku dosen penguji atas bimbingan, tanggapan dan saran yang diberikan.

4. Wibi Riawan, S.Si., M.Biomed selaku dosen penguji atas bimbingan, tanggapan dan saran yang diberikan.
5. Bapak Sujoko, Ibu Titin Mega Ana, serta keluarga besar yang begitu ikhlas menyayangi serta begitu sabar menanti, mendorong, membantu penulis selama belajar di Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
6. Eni Wulandari, Geta Darantika, Gilang Siwi Pamungkas, dan Vetri Handayani selaku teman seperjuangan dalam menyelesaikan penelitian ini.
7. Seluruh staf dan karyawan FKH, yang telah membantu proses administrasi dalam membuat tugas akhir.
8. Seluruh Asisten Laboratorium Biokimia dan Seluler FMIPA Universitas Brawijaya atas segala bantuan yang telah diberikan kepada penulis.
9. Teman-teman kolega khususnya Awangga, Azizah, Dedy, Eka, Esa, Fani, Gabriella, Hilda, Jafar, Lucia, Min, Onky, Sonnya, Yaya, Yuanti, dan teman-teman lain yang telah menjadi keluarga baru selama proses pendidikan di Kedokteran Hewan dan menjadi pendorong untuk meraih kesuksesan.
10. Keluarga Besar Laboratorium Anatomi Veteriner, DPM FKH UB, dan BPI IMAKAHL.
- 11.

Tulisan ini masih jauh dari sempurna, saran – saran demi kebaikan dan pengembangan isi tugas sarjana ini akan diterima dengan senang hati.

Malang, Agustus 2018

Penulis

DAFTAR ISI

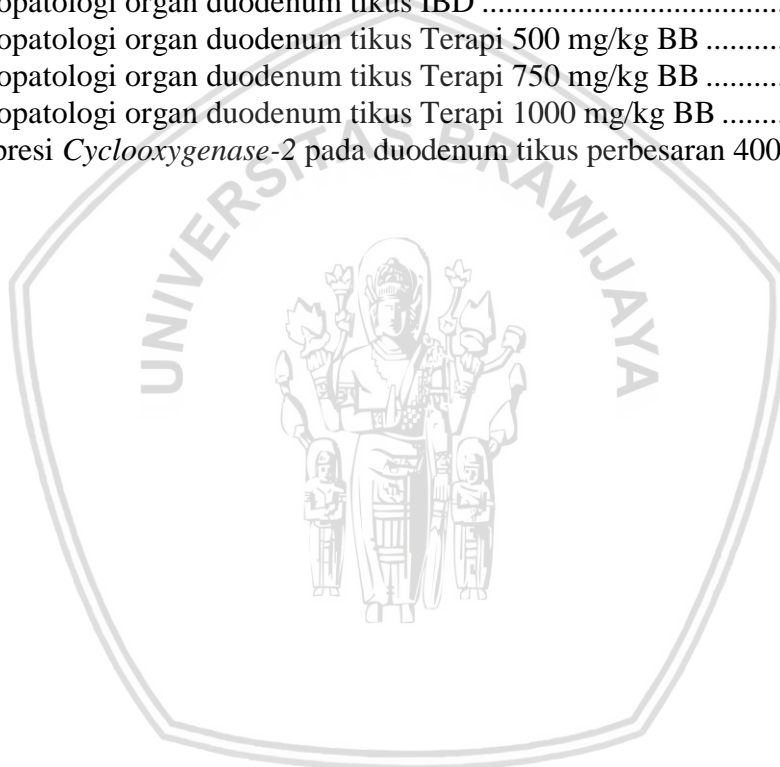
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Hewan Coba Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Inflammatory Bowel Disease (IBD)	6
2.2. Indometasin	9
2.3. Inflammatory Bowel Disease	10
2.3.1. Etiologi	10
2.3.2. Patomekanisme	11
2.4. Duodenum	12
2.5. Cyclooxygenase-2 (COX 2)	15
2.6. Kamboja Putih	16
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	19
3.1. Kerangka Konsep	19
3.2. Hipotesis Penelitian	21
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	22
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	22
4.2. Sampel Penelitian	22
4.3. Rancangan Penelitian	23
4.4. Variabel Penelitian	24
4.5. Alat dan Bahan Penelitian	24
4.6. Tahapan Penelitian	25
4.7. Prosedur Penelitian	26
4.7.1. Persiapan Hewan Coba	26
4.7.2. Persiapan Hewan Model IBD dengan Induksi Indometasin	26
4.7.3. Penentuan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (<i>Plumeria acuminata</i>)	27



4.7.4.	Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (<i>Plumeria acuminata</i>)	28
4.7.5.	Pengambilan Organ Duodenum.....	29
4.7.6.	Pembuatan Preparat Histopatologi	29
4.7.7.	Prosedur Pewarnaan dengan <i>Hematoksilin Eosin</i> (HE)	30
4.7.8.	Pengamatan Preparat Histopatologi Duodenum	31
4.7.9.	Prosedur Pewarnaan dengan Metode Imunohistokimia	32
4.7.10.	Pengamatan dan Perhitungan Area Ekspresi COX-2.....	33
4.8.	Analisa Data	33
BAB 5	METODOLOGI PENELITIAN.....	35
5.1.	Histopatologi Duodenum Tikus Model <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (IBD) setelah Diterapi dengan Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (<i>Plumeria acuminata L.</i>).....	35
5.2.	Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (<i>Plumeria acuminata L.</i>) Terhadap Ekspresi Cyclooxygenase-2 pada Hewan Model <i>Inflammatory Bowel Disease</i> (IBD) Hasil Induksi Indometasin.....	41
BAB 6	PENUTUP	47
6.1.	Kesimpulan	47
6.2.	Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	53

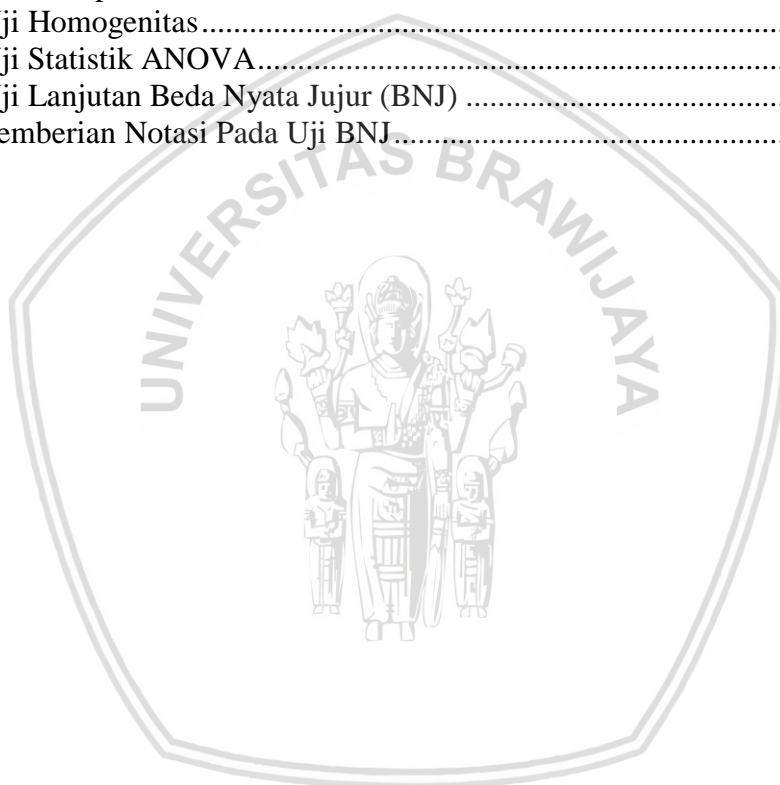
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Tikus Putih (<i>Rattus novergicus</i>).....	8
2.2. Patomekanisme IBD (<i>Inflammatory Bowel Disease</i>)	12
2.3. Histologi normal (A) dan histopatologi IBD (B) duodenum	15
2.4. Kamboja putih (<i>Plumeria acuminata L.</i>)	17
5.1. Histologi organ Duodenum tikus normal	36
5.2. Histopatologi organ duodenum tikus IBD	36
5.3. Histopatologi organ duodenum tikus Terapi 500 mg/kg BB	37
5.4. Histopatologi organ duodenum tikus Terapi 750 mg/kg BB	37
5.5. Histopatologi organ duodenum tikus Terapi 1000 mg/kg BB	37
5.6. Ekspresi <i>Cyclooxygenase-2</i> pada duodenum tikus perbesaran 400x	42



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Rancangan Kelompok Penelitian	24
5.1. Ekspresi COX-2 pada jaringan duodenum tikus (<i>Rattus norvegicus</i>) model IBD hasil induksi Indometasin yang diterapi ekstrak metanol daun kamboja putih.....	44
L 6.1. Komposisi Larutan.....	63
L 10.1 Data Ekspresi COX-2	67
L 12.1 Uji Homogenitas.....	68
L 12.2 Uji Statistik ANOVA.....	68
L 12.3 Uji Lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ)	68
L 12.4 Pemberian Notasi Pada Uji BNJ.....	69



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Surat keterangan Identitas Tanaman	54
2. Sertifikat Laik Etik.....	55
3. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian	56
4. Perhitungan Dosis Indometasin.....	58
5. Penentuan dosis dan pembuatan ekstrak metanol daun kamboja.....	58
6. Komposisi Larutan	63
7. Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum	64
8. Pembuatan Preparat dengan Pewarnaan Hematoxylin Eosin.....	65
9. Pembuatan Preparat dengan teknik Imunohistokimia COX-2	66
10. Perhitungan Ekspresi COX-2	67
11. Presentasi Peningkatan dan Penurunan Ekspresi COX-2	67
12. Hasil Uji Statistik Ekspresi COX-2.....	68
13. Hasil Uji LCMS	70



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan	Keterangan
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
IBD	: <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
COX-1	: <i>Cyclooxygenase-1</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
DAB	: <i>Diamano Benziidine</i>
BB	: Berat Badan
EGF	: Epidermal growth factor
HE	: Hematoksilin-Eosin
NSAID	: <i>Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs.</i>
PBSA	: <i>Phosphat Buffer Saline Azida</i>
PFA	: <i>Paraformal Aldehida</i>
PGE2	: Prostaglandin E2
PGI2	: Prostacyclin
RAL	: Rancangan Acak lengkap
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan salah satu penyakit inflamasi kronis yang terjadi pada saluran pencernaan (Klein and Eliakim, 2010). Menurut Costas dan Kefalas (2003) *Inflammatory bowel disease* (IBD) terdiri atas dua tipe, yaitu *Chron's Disease* dan *Ulcerative Colitis*. *The Queen Mother Hospital* mencatat bahwa pada 1 Agustus 2003 sampai 31 Desember 2009 kasus IBD pada hewan sering terjadi pada anjing yang mencapai 546 kasus dengan 86 ras yang berbeda (Kathrani *et al.*, 2011). Gejala klinik dari IBD ditandai dengan nyeri abdomen, demam, diare intermiten dan penurunan berat badan. *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) umumnya terjadi karena faktor genetik, flora normal usus, dan faktor lingkungan serta obat NSAID (Klein and Eliakim, 2010).

Menurut Takeuchi *et al.*, (2003) penggunaan obat antiinflamasi nonsteroid (*Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug* (NSAIDs)) seperti indometasin dapat menyebabkan IBD. Dalam kerjanya indometasin menghambat *cyclooxygenase 1* (COX-1) yang berperan dalam pembentukan prostaglandin usus. Hal tersebut menyebabkan penurunan produksi prostaglandin sehingga akan menghambat sekresi mukus di duodenum yang berfungsi sebagai barier mukosa duodenum. Penggunaan indometasin dapat menyebabkan kerusakan jaringan seperti erosi dan ulcer pada mukosa lambung dan usus halus serta perdarahan kolon (Takeuchi, 2012).

Penanganan kasus IBD selama ini dengan menggunakan obat-obatan kimia, seperti kortikosteroid. Namun penggunaan bahan kimia dalam jangka panjang mampu memperparah terjadinya inflamasi. Penggunaan tanaman herbal menjadi salah satu alternatif terapi karena dinilai lebih aman dibandingkan dengan obat-obatan kimia dilihat dari segi toksisitas dan efek samping. Tanaman kamboja putih (*Plumeria acuminata*) merupakan salah satu tanaman untuk alternatif terapi IBD. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Shinde *et al* (2014), tanaman kamboja putih (*Plumeria acuminata*) memiliki efek farmakologi seperti antiinflamatori, antioksidan, antipiretik, dan antimikroba. Kandungan yang terdapat pada daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) berupa *lupeol acetate*, *lupeol carboxylic acid*, *urosilic acid* dan *stigmast-7-enol* (Devprakash, *et al.*, 2011). *Lupeol acetate* yang terkandung dalam daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) merupakan turunan dari triterpenoid yang berfungsi sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Antioksidan memiliki peran penting untuk menghambat dan menangkap radikal bebas.

Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji ekspresi COX-2 dan gambaran histopatologi organ duodenum pada hewan model IBD yang diterapi dengan ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*). Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi indometasin untuk membuat hewan model IBD.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut:

1. Apakah terapi ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dapat mempengaruhi gambaran histopatologi organ duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar model IBD hasil induksi indometasin?
2. Apakah terapi ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dapat mempengaruhi ekspresi COX-2 organ duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar model IBD hasil induksi indometasin?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) D'Wistar Bandung, Jawa Barat dengan umur 8-12 minggu. Berat badan tikus antara 150-200 gram. Penggunaan hewan coba ini telah mendapatkan sertifikat dari komisi Etik UB dengan No. 305-KEP-UB.
2. Pembuatan hewan model IBD dilakukan dengan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB yang diberikan hanya satu kali secara per oral (Aulanni'am, 2012).
3. Daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari tempat pemakaman umum Kelurahan

Penanggunan Kecamatan Lowokwaru Malang dan sudah mendapatkan surat keterangan taksonomi dari Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

4. Ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dibuat dengan metode maserasi.
5. Terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) diberikan dengan dosis 500 mg/kg BB, 750 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB selama 14 hari (Gupta *et al.*, 2006).
6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi COX-2 dengan metode imunohistokimia dan gambaran histopatologi organ duodenum dengan pewarnaan HE.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) terhadap gambaran histopatologi organ duodenum hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin.
2. Mengetahui pengaruh terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) terhadap ekspresi COX-2 organ duodenum hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi mengenai manfaat ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) sebagai alternatif terapi herbal untuk IBD



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel*

Disease (IBD)

Hewan Coba yang digunakan untuk penelitian ini adalah Tikus putih (*Rattus norvegicus*) stain Wistar. Hewan percobaan harus memenuhi persyaratan genetik dan memperlihatkan reaksi biologis yang dikehendaki. *Rattus norvegicus* adalah hewan percobaan paling populer dalam penelitian yang berkaitan dengan pencernaan (Hofstetter *et al.*, 2005). Hewan ini dipakai dengan pertimbangan yaitu pola makan omnivora atau pemakan segala makanan, memiliki saluran pencernaan dengan tipe monogastrik. Penggunaan hewan coba ini juga disebabkan karena tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar memiliki jumlah anak yang banyak pada setiap kelahirannya dan reproduksinya menyerupai mamalia besar. Tikus (*Rattus norvegicus*) memiliki beberapa keunggulan, yaitu pemeliharaan dan penanganan mudah, kemampuan reproduksi tinggi dan masa kebuntingan singkat (Bogdanske *et al.*, 2010), serta cocok untuk berbagai penelitian karena beberapa organ tikus lebih mirip manusia dari pada organ mencit. (Hankenson, 2014).

Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* adalah memiliki hidung tumpul, panjang badan 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, telinga relatif kecil. Tikus memiliki masa hidup 2,5-3,5 tahun, denyut jantung 330-480 kali/menit, frekuensi respirasi 85 kali/menit. Berikut klasifikasinya (Armitage, 2004):

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub filum	: Vertebrata
Classis	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Sub ordo	: Sciurognathi
Familia	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> strain Wistar

Rattus norvegicus merupakan hewan coba yang sering digunakan dalam penelitian karena berbagai pertimbangan, antara lain omnivora, pemeliharaan dan penanganan yang mudah, potensi reproduksi tinggi, dan memiliki masa bunting yang pendek (Sirois, 2005). Selain itu, tikus mudah diberikan perlakuan secara oral dan tidak muntah karena tikus tidak memiliki kantung empedu. Tikus ini memiliki kebutuhan pakan yaitu 28 gr/hari (Hofstetter *et al.*, 2005). Pakan bisa berupa ikan, daging, biji-bijian dan lain-lain. Sedangkan mencit *Mus Musculus* lebih menyukai biji-bijian. Anjing, kucing, dan tikus *Rattus norvegicus* memiliki kesamaan yakni resisten terhadap pakan yang mengandung kolesterol, serta mudah dicekok dan tidak mengalami muntah karena tikus ini tidak memiliki kantung empedu (Sirois, 2005).



Gambar. 2.1 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Bogdanske, *et al*, 2010)

Menurut Corridoni, *et al* (2004) menyatakan bahwa tikus digunakan sebagai hewan model IBD karena mudah diinduksi secara kimia. Penelitian sebelumnya menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dibuat IBD karena induksi obat-obatan NSAID. Obat yang digunakan adalah indometasin dan diberikan secara per oral. Indometasin di dalam usus halus akan menghambat *Cyclooxygenase* (*non-selective cyclooxygenase inhibitor*) baik *Cyclooxygenase 1* (COX-1) maupun *Cyclooxygenase 2* (COX-2). Penghambatan *Cyclooxygenase* menyebabkan penurunan produksi prostaglandin. Prostaglandin didalam usus halus berperan menstimulasi mukus dan sekresi bikarbonat serta menyebabkan vasodilatasi, suatu aksi yang menjaga mukosa saluran pencernaan. Efek pemberian indometasin menyebabkan sekresi HCL meningkat dan menurunkan sekresi mukus sehingga terjadi IBD (Sparkes, 2010). Pembuatan hewan model IBD menggunakan Indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB. Kondisi IBD dapat terjadi 24 jam pasca induksi indometasin (Aulanni'am *et al.*, 2012).

2.2. Indometasin

Indometasin merupakan salah satu obat antiinflamasi derivat indol-asam asetat dari golongan *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs* (NSAID). Aktivitas farmakodinamik indometasin yaitu bersifat analgesik, antipiretik dan antiinflamasi (Matsui *et al.*, 2011; Laudanno *et al.*, 2006). Indometasin diabsorpsi baik secara per oral, 92-99% indometasin terikat dengan plasma darah. Indometasin adalah salah satu obat NSAID yang efektif, tetapi memiliki resiko yang lebih tinggi dengan efek samping berupa ulserasi, pendarahan lambung, diare, sakit kepala dan pusing. Indometasin juga dapat menyebabkan *dyscrasias* pada darah. (Wilmana, 2007).

Indometasin bekerja dengan menghambat enzim *cyclooxygenase* yang mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin. Enzim *Cyclooxygenase* terdiri atas *Cyclooxygenase-1* (COX-1) dan *Cyclooxygenase-2* (COX-2). COX-1 berperan dalam menjaga permukaan lambung dan usus tetap baik dengan mencegah pembentukan asam lambung, meningkatkan sekresi mukus dan asam bikarbonat. COX-2 berperan dalam pembentukan prostaglandin ketika terjadi inflamasi akut. Indometasin bekerja menghambat COX-1 dan COX-2 tetapi lebih spesifik menghambat COX-1. Penghambatan COX-1 dapat meningkatkan ekspresi dari COX-2, tetapi karena indometasin dapat menghambat COX-2 maka produksi prostaglandin menurun. Penurunan produksi prostaglandin disebabkan penghambatan kerja enzim *cyclooxygenase* dalam merubah asam arakidonat menjadi prostaglandin. Mekanisme penghambatan COX-1 menyebabkan terjadinya iritasi usus

berupa lesi pada mukosa yang menimbulkan perdarahan usus (Taukechi, 2012).

Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAID) menyebabkan hipermotilitas pada saluran pencernaan khususnya duodenum, diikuti dengan kerusakan kapiler dan aktivasi neutrofil yang memicu terjadinya kerusakan duodenum. Hipermotilitas duodenum dan rusaknya pembuluh darah berkaitan dengan penurunan prostaglandin akibat hambatan dari COX-1. Penghambatan pada COX-1 dapat meningkatkan ekspresi COX-2, sehingga dihasilkan PGE2 yang dapat menekan interaksi neutrofil dengan endotel, oleh karena itu, indometasin dapat meredakan gejala peradangan seperti nyeri, tetapi dapat menyebabkan kerusakan duodenum (Takeuchi, 2012).

2.3. Inflammatory Bowel Disease (IBD)

2.3.1. Etiologi

IBD merupakan penyakit inflamasi kronis yang menyerang saluran pencernaan mulai dari mulut hingga kolon. Terjadinya IBD bisa disebabkan oleh bakteri, seperti *Helicobacter pylori* dan enterohepatic *Helicobacter* (EHH) yang mana bakteri tersebut melakukan kolonisasi diusus halus dan hepar, sehingga mampu menyebabkan terjadinya IBD. *Helicobacter pylori* biasanya menempel pada permukaan epitel lambung dan juga ditemukan pada kolon, sehingga keberadaan bakteri tersebut juga mampu menyebabkan terjadinya IBD (Kenaan *et al.*, 2010). Adanya pakan yang kurang bersih yang diberikan pada hewan dapat memicu terjadinya IBD.

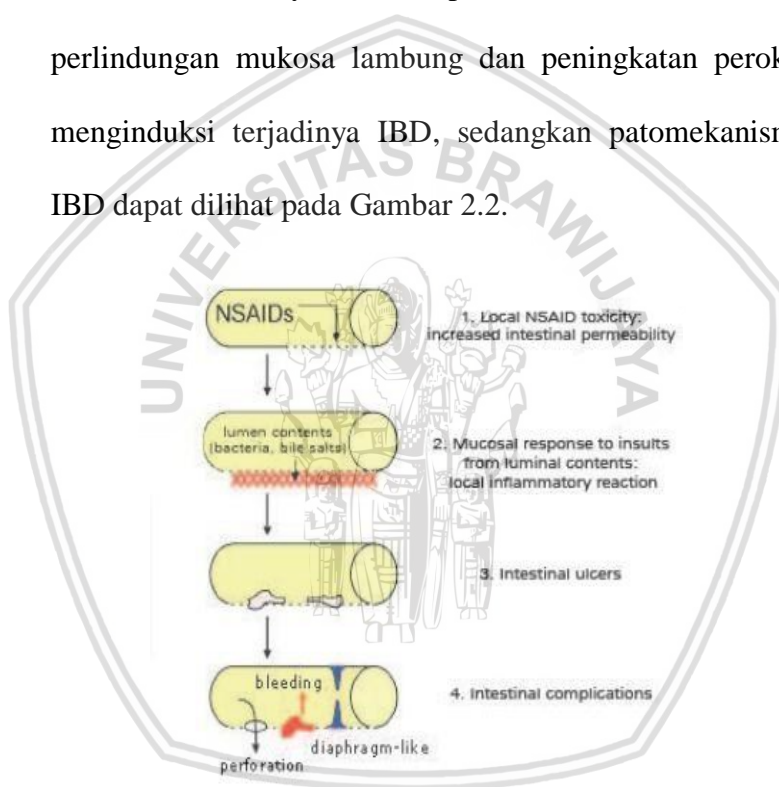
Kelainan genetik dan gangguan regulasi imunologi juga dapat menyebabkan terjadinya IBD (Gradel *et al.*, 2009). Selain itu, *Non-Steroidal Antiinflammatory Drug* (NSAID) seperti indometsin, aspirin, ketoprofen, dan ibuprofen dapat menyebabkan penurunan mukosa saluran pencernaan sehingga dapat menyebabkan IBD (Tanaka *et al.*, 2006).

2.3.2. Patomekanisme

Jalur akhir umum daripada patofisiologi IBD adalah inflamasi pada mukosa traktus intestinal menyebabkan ulserasi, edema, perdarahan, kemudian hilangnya air dan elektrolit yang diikuti terjadinya hipoksia. Kondisi tersebut dapat menyebabkan kebocoran mitokondria dan keluarnya elektron-elektron dari mitokondria yang mana akan ditangkap oleh Cu^{2+} dan Fe^{2+} . Elektron-elektron yang berikatan dengan Cu^{2+} dan Fe^{2+} akan menghasilkan ion O_2^- dan H_2O_2 . Ion O_2^- dan H_2O_2 berkonjugasi dan menghasilkan radikal hidroksil (OH^*) yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan struktur protein dan peroksidasi lipid (Konturek *et al.*, 2003).

Banyak mediator inflamasi yang telah diidentifikasi pada IBD, dimana mediator-mediator ini memiliki peranan penting pada patologi dan karakteristik klinik penyakit ini. Sitokin yang dikeluarkan oleh makrofag karena respon daripada berbagai rangsangan antigenik, berikatan dengan reseptor-reseptor yang berbeda, kemudian menghasilkan efek-efek autokrin, parakrin, dan endokrin. Sitokin juga

akan mendiferensiasikan limfosit menjadi berbagai tipe sel T. Sel T helper tipe 1 (TH-1) berhubungan dengan *Crohn Disease*, sedangkan TH-2 berhubungan dengan *Ulcerative Colitis*. Respon imun inilah yang akan merusak mukosa intestinal dan menyebabkan proses inflamasi yang kronis (Danastri dan Ida, 2011). Adanya radikal bebas berlebih dalam sel menyebabkan penurunan antioksidan, penurunan perlindungan mukosa lambung dan peningkatan peroksidasi dapat menginduksi terjadinya IBD, sedangkan patomekanisme teradinya IBD dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Patomekanisme IBD (Paiotti, 2014).

2.4. Duodenum

Intestinum umumnya memiliki dua fungsi utama yaitu pencernaan dan penyerapan. Makanan yang masuk melalui mulut kemudian dilanjutkan oleh organ traktus digestivus. Proses pencernaan makanan di duodenum seperti pencernaan karbohidrat, lemak dan protein menjadi zat yang lebih sederhana

oleh bantuan enzim pankreas. Proses pencernaan lemak membutuhkan garam empedu untuk mengemulsi lemak agar dapat di absorpsi. Pada epitel usus halus juga terdapat enzim yang digunakan untuk memecah disakarida maupun polimer glukosa kecil menjadi monosakarida yaitu laktosa, sukrosa dan maltosa (Eroschenko, 2003). Absorpsi gula, asam amino dan lemak sebagian besar terjadi di duodenum dan jejunum (Guyton, 2007).

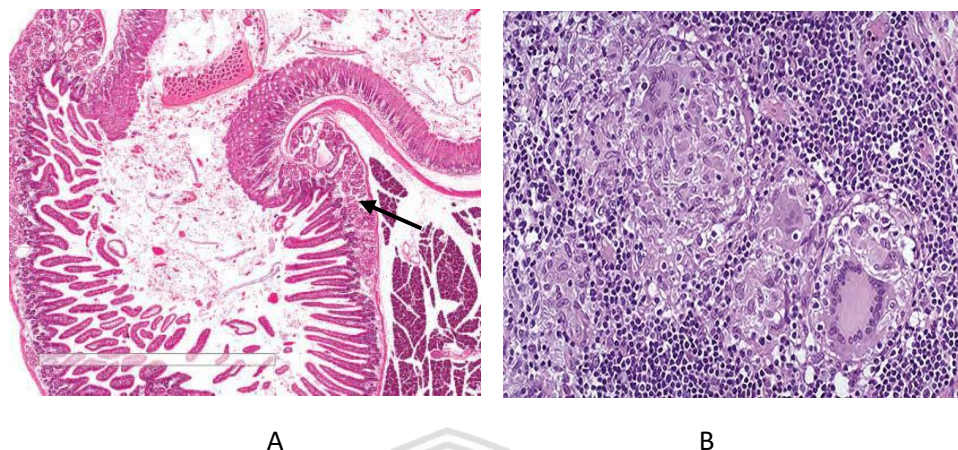
Efisiensi fungsi absorpsi duodenum dipengaruhi oleh struktur mukosa duodenum yang disebut plika sirkularis. Plika sirkularis mampu meningkatkan daerah permukaan absorpsi mukosa menjadi tiga kali lipat. Duodenum memiliki kelenjar duodenum (brunner) yang terletak di submukosa duodenum. Kelenjar brunner menghasilkan mukus yang bersifat alkalis untuk melindungi dinding duodenum dari asam lambung yang bersifat sangat asam. Kelenjar ini menghasilkan hormon sekretin yang mampu menghambat sekresi HCL lambung dan akan meningkatkan proliferasi epitel dalam usus halus (Eroschenko, 2003).

Gambaran patologi gastrointestinal yang terkena rangsangan berupa jejas umumnya menimbulkan erosi mukosa dan ulserasi mukosa. Erosi mukosa merupakan keadaan kehilangan sebagian dari ketebalan mukosa, sedangkan ulserasi mukosa merupakan keadaan hilangnya seluruh tebal mukosa (Eroschenko, 2003). Adanya rangsangan baik endogen maupun eksogen yang menimbulkan jejas sel akan menyebabkan reaksi radang. Radang pada duodenum menyebabkan terjadinya kerusakan pada permukaan mukosa duodenum. Ketika duodenum mengalami jejas, kelenjar brunner akan

memproduksi faktor penumbuh epidermal (EGF) yang tahan terhadap tripsin, kemotripsin dan pepsin. EGF bekerja dengan memodulasi sekresi asam lambung dan mempengaruhi kecepatan proliferasi dalam kriptus usus (Fawcett and William, 2002).

Manifestasi klinik radang pada gambaran histologi duodenum ditemui gambaran sel radang sampai pada mukosa lamina propria, deskuamasi epitel, erosi dan ulserasi pada mukosa duodenum (Fawcett and William, 2002). Salah satu penyebab kerusakan pada duodenum yaitu pemakaian obat golongan NSAIDs (*Non-Steroid Anti Inflammatory Drugs*) secara kronik dan reguler. Obat golongan NSAIDs bersifat asam sehingga menyebabkan kerusakan epitel pada gastroduodenal (Furst and Ulrich, 2007).

Gambaran histopatologi duodenum IBD dapat ditemukan kelainan berupa epitel permukaan yang masih utuh, walaupun epitel permukaan terlepas namun terbatas pada lapisan permukaan mukosa, pada IBD erosif terdapat hemoragik akut dimana perdarahannya segar, nekrosis bersifat fokal pada permukaan dan daerah mukosa. Sel radang ditemukan pada daerah lumen kelenjar disertai dengan penumpukan sel limfosit (Klatt, 2015), namun peradangan tidak terjadi secara menyeluruh. Bila erosi meluas lebih dalam dapat berkembang menjadi ulkus (Junquiera *et al.*, 2004) dapat dilihat pada Gambar 2.3 (B).



Gambar 2.3. Histologi normal duodenum

Keterangan: (A) yang menunjukkan letak kelenjar brunner (anak panah hitam) dan histopatologi IBD (B) yang menunjukkan inflamasi berbentuk granuloma dan penumpukan dari sel limfosit pada sel epitel (Rishi, 2017).

2.5. *Cyclooxygenase-2* (COX 2)

Enzim *cyclooxygenase* terdapat dalam 2 isoform disebut COX-1 dan COX-2. Kedua isoform tersebut telah dikode oleh gen yang berbeda dan ekspresinya bersifat unik. Secara garis besar COX-1 esensial dalam pemeliharaan berbagai fungsi dalam kondisi normal di berbagai jaringan khususnya ginjal, saluran cerna, dan trombosit. Di mukosa duodenum, aktivasi COX-1 menghasilkan prostasiklin yang bersifat sitoprotektif. *cyclooxygenase-2* semula diinduksi berbagi stimulus inflamatoar, termasuk sitokin, endotoksin.

Cyclooxygenase-2 merupakan enzim yang tersusun dari 604 asam amino. Enzim ini berfungsi merubah asam arakidonat menjadi berbagai macam protaglandin. Berbeda dengan isoformnya, COX-1 yang terekspresi di berbagai organ secara fisiologis karena berguna untuk mempertahankan kondisi dan fungsi berbagai organ, COX-2 terekspresi pada organ-organ dengan stimulus

dan induksi seperti sitokin dan faktor pertumbuhan yang umumnya terjadi saat inflamasi (Cheng, 2013).

Dalam proses inflamasi, PGE2 yang merupakan hasil konversi asam arakidonat oleh COX-2 berperan penting dalam mutasi gen dan proliferasi sel. PGE2 menstimulasi pertumbuhan pembuluh darah, menghambat fungsi imun, dan meregulasi sinyal transduksi sel yang sangat berpengaruh pada pertumbuhan sel tumor. (Li, *et al*, 2013). Ekspresi COX-2 yang berperan penting dalam proses inflamasi, berhubungan pula dengan mutasi dan gen-gen supresor. Overekspresi COX-2 sendiri terbukti berkorelasi dengan peningkatan biosintesis PGE2 dan angiogenesis. COX-2 juga dapat meningkatkan ekspresi Bcl-2 yang menyebabkan penghambatan apoptosis dari sel endotelial dan menginduksi formasi pembuluh darah baru, sehingga dengan dihamatnya pembentukan COX-2 diharapkan mampu menjadi pencegah progresifitas keganasan pada kasus inflamasi duodenum (Cheng, 2013).

2.6. Kamboja Putih

Kamboja putih (*Plumeria acuminata*) merupakan tanaman yang berasal dari Meksiko, Amerika Tengah dan Amerika selatan. Tanaman ini tersebar di seluruh daerah tropis, salah satunya di Indonesia. Kamboja banyak digunakan sebagai obat demam, diare, gatal dan nyeri. Secara morfologi pohon kamboja memiliki ketinggian 3-7 meter, batangnya bengkok dan mengandung getah rantingnya besar, daun berbentuk lonjong dengan panjang 4 cm dan lebar 7 cm. Mahkota berbentuk corong, sisi dalam berambut, sisi luar putih sisi dalam

kekuningan, berbau harum. Tangkai putik pendek, tumpul, lebar, bakal buah 1 atau 2, berbentuk tabung gepeng memanjang 18-20 cm, lebar 1-2 cm, berbiji banyak, biji bersayap, ketika masih muda hijau setelah tua hitam kecoklatan (Shinde, 2014). Morfologi tanaman kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.) dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.) (Shinde, 2014).

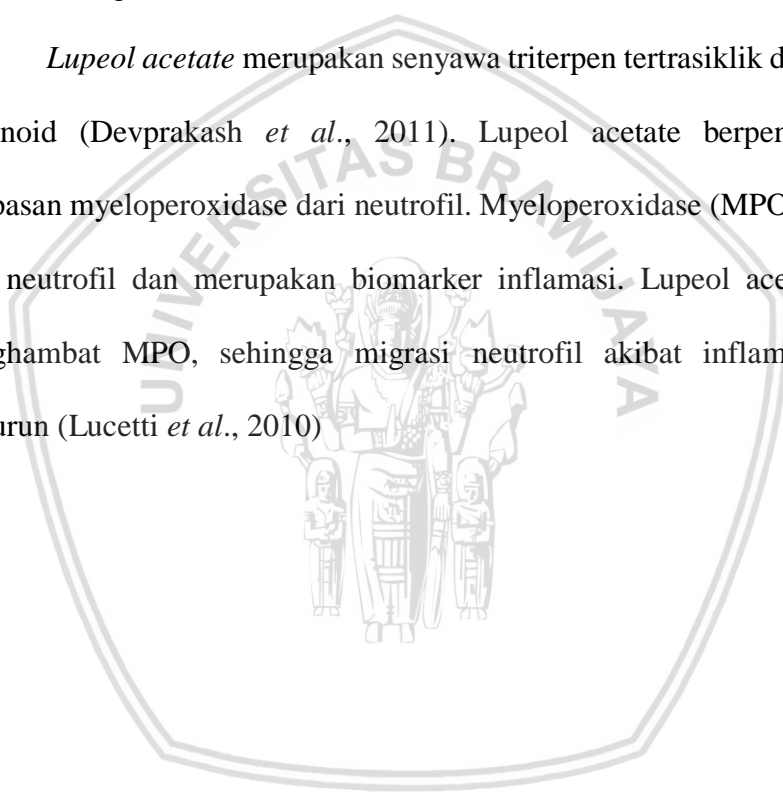
Taksonomi dari kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dapat dijelaskan sebagai berikut:

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Ordo : Gentianales
- Family : Apocynaceae
- Genus : *Plumeria*
- Spesies : *Plumeria acuminata*

Kandungan yang terdapat pada akar yaitu fulvoplummerin, plumericin, isoplumericin, β -dihydroplumericin dan asam β dihydroplumericinic.

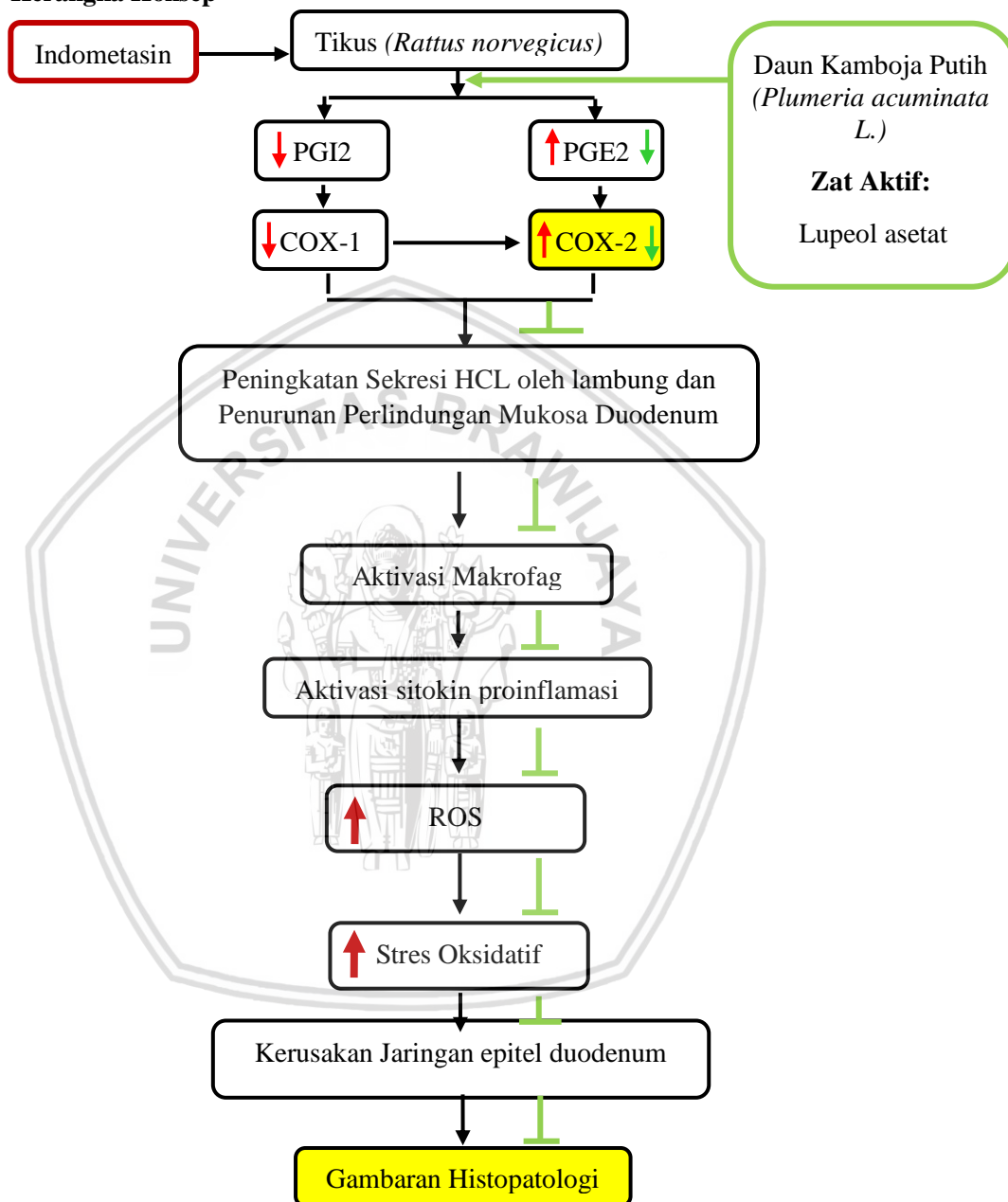
Kandungan lain yang terdapat pada batang *Plumera acuminata L.* yaitu minyak esensial yang terdiri atas alkohol, geraniol, citronellol, famesol dan fenylethyl alkohol dengan sedikit jumlah aseton (6,8 %). Sedangkan, kandungan yang terdapat pada daun yaitu stigmast-7-enol, asam lupeol karbosilik, lupeol asetat dan ursolik. Zat lupeol asetat yang terkandung pada daun diketahui memiliki aktifitas sebagai antiinflamasi dan antioksidan (Pand, 2006).

Lupeol acetate merupakan senyawa triterpen tertrasiklik dari golongan terpenoid (Devprakash *et al.*, 2011). Lupeol acetate berpengaruh pada pelepasan myeloperoxidase dari neutrofil. Myeloperoxidase (MPO) dilepaskan oleh neutrofil dan merupakan biomarker inflamasi. Lupeol acetate bekerja menghambat MPO, sehingga migrasi neutrofil akibat inflamasi menjadi menurun (Lucetti *et al.*, 2010)



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep



Keterangan gambar:

 : Induksi Indometasin

 : Mekanisme di dalam tubuh tikus

 : Parameter yang dimati

 : Terapi ekstrak daun kamboja

↓ : Jalur di dalam tubuh tikus

↑ : Pengaruh induksi Indometasin

↓ : Pengaruh Daun Kamboja Putih

⊥ : Menghambat

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan penyakit inflamasi pada saluran gastrointestinal yang ditandai dengan peradangan dan infiltrasi seluler pada mukosa lambung, usus halus dan usus besar yang diawali dengan masuknya agen kausatif ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan. Agen kausatif yang digunakan berupa indometasin. Indometasin merupakan salah satu obat golongan NSAID penyebab IBD karena mekanisme kerja indometasin dapat menghambat *cyclooxygenase-1* (COX-1) dan *cyclooxygenase-2* (COX-2). Secara normal enzim COX-1 dan COX-2 terdapat dalam jumlah kecil pada jaringan. COX-1 berfungsi memberikan efek perlindungan terhadap mukosa duodenum. Sedangkan COX-2 muncul karena adanya suatu inflamasi.

COX-1 dan COX-2 diinduksi oleh sitokin dan adanya stress pada jaringan. Salah satu efek penggunaan obat NSID yaitu dapat menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi HCL pada lambung, penurunan aliran darah mukosa usus dan penurunan sekresi mucus. Hal ini dapat memicu aktifitas makrofag dalam memfagositosis sel debris dari sel nekrosis dan menginduksi keluarnya sitokin proinflamasi yang kemudian merangsang mediator inflamasi dan peningkatan produksi *Reactive Oxide Species* (ROS). Peningkatan ROS akan menimbulkan stress oksidatif, selanjutnya stress oksidatif akan menyebabkan terganggunya fungsi sel sehingga terjadi kerusakan jaringan pada duodenum.

Kandungan lupeol asetat yang ada pada daun kamboja putih merupakan senyawa turunan dari triterpenoid yang dapat digunakan sebagai

antiinflamatori dan antioksidan. Antioksidan mempunyai peran penting untuk menstabilkan radikal bebas dengan menghambat proses peroksidasi lipid dan menghentikan stress oksidatif sehingga peningkatan COX-2 dapat ditekan. Kemampuan lupeol asetat dalam menghambat sitokin proinflamasi juga dapat menyebabkan berkurangnya keparahan inflamasi sehingga kerusakan sel-sel pada duodenum dapat berkurang kemudian dapat memperbaiki gambaran histologi pada jaringan duodenum

3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis penelitian ini adalah :

1. Terapi Ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminta L.*) dapat memperbaiki gambaran histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD yang telah di induksi dengan indometasin.
2. Terapi Ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminta L.*) dapat menurunkan kadar COX-2 pada jaringan duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD yang telah di induksi dengan indometasin.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Juni 2015. Pembuatan Tikus model IBD dan pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dilaksanakan di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya. Pengoleksian sampel dilakukan di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Pembuatan preparat Immunohistokimia dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Pembuatan preparat untuk Histopatologi duodenum dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang berumur 8-12 minggu dengan berat badan antara 150-200 gram. Aklimatisasi dilakukan selama tujuh hari agar tikus beradaptasi dengan kondisi laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok sehingga total hewan coba yang diperlukan sebanyak 20 ekor.

4.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan sederhana dimana hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok secara acak (Tabel 4.1). Setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus mendapat perlakuan berbeda-beda. Kelompok A adalah tikus yang tidak diberi perlakuan sebagai kontrol negatif. Kelompok B adalah tikus yang diberi indometasin sebagai kontrol positif. Kelompok C adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dengan dosis 500 mg/kg BB. Kelompok D adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dengan dosis 750 mg/kg BB. Kelompok E adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dengan dosis 1000 mg/kg BB.

Tabel 4.1. Rancangan kelompok penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan			
ktivitas COX-2 dan Histopatologi Duodenum	1	2	3	4
Kelompok A (kontrol negatif)				
Kelompok B (kontrol positif)				
Kelompok C (terapi 500mg/kg BB)				
Kelompok D (terapi 750mg/kg BB)				
Kelompok E (terapi 1000mg/kg BB)				

4.4. Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- Variabel Bebas : Induksi indometasin dan dosis ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*)
- Variabel tergantung : Aktivitas COX-2 dan Histopatologi duodenum
- Variabel kendali : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan Strain Wistar, berumur 8-12 minggu, berat badan 150-200 gram, pakan, minum, suhu dan kelembaban kandang.

4.5. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, spuit 5 mL, spuit 1 mL, gunting, objek glass, scalpel, mortar, microtube, water bath 100°C, alat bedah, vortex, kertas saring, micropipet, tabung reaksi 250 mL, tabung reaksi 10 mL, cawan petri, tabung erlenmeyer, corong kaca, tabung

ependorf, cup plastik, *cover glass*, *micropipet*, *Freezer*, oven, dan mikroskop olympus BX-51.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), indometasin, minyak jagung, larutan, fosfat buffer saline (PBS), paraformaldehidat (PFA), aquades, antibodi anti-rat COX-2, DAB (diaminobenzidin), Dako LSAB (*labeled streptavidin biotin*) system-HRP (berisi *anti rabbit IgG biotin labeled* dan Strepto-avidin peroksidase) (LOT 100478443), pewarna histologi Hematoksin Eosin (HE), NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95%, parafin, xylol, chloroform, alkohol absolut, metanol, daun kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.), entelan, dan eter 70%.

4.6. Tahapan Penelitian

Tahapan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

- Persiapan Hewan Coba
- Persiapan Hewan Model IBD dengan Induksi Indometasin
- Penentuan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*)
- Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*)
- Pengambilan Organ Duodenum
- Pembuatan Preparat Histopatologi
- Pewarnaan dengan Hematoksin Eosin
- Pengamatan Preparat Histopatologi Duodenum
- Pengamatan Ekspresi COX-2 dengan Metode Imunohistokimia

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian di aklimatisasi selama tujuh hari, sehingga dapat beradaptasi dengan lingkungan laboratorium. Tikus di beri pakan ransum basal yang disusun berdasarkan *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, vitamin dan air. Rata-rata konsumsi pakan tikus perhari (5g/100gBB/hari) dan diberikan air minum *adlibitum*. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

Kandang tikus berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm, dengan jumlah tikus sesuai dengan kebutuhan. Kandang terbuat dari bahan plastik. Suhu optimum untuk kandang tikus adalah 22-24 °C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup. Kandang tikus harus berlokasi di tempat yang tenang, sehingga tikus tidak stres.

4.7.2. Persiapan Hewan Model IBD dengan Induksi Indometasin

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) di induksi indometasin secara per oral dengan dosis 15mg/kg BB tikus (Aulani'am, 2012). Adapun sebelum Indometasin diberikan pada tikus, harus dilakukan pengenceran dengan minyak jagung terlebih dahulu. Tikus yang digunakan memiliki berat badan rata-rata sekitar 160 gram. Dosis indometasin yang diberikan pada setiap tikus adalah 2,4 mg/tikus. Pengenceran indometasin sebanyak 45 mg dibutuhkan 4 mL minyak jagung sebagai pelarutnya (Bures *et al.*,

2011). Perhitungan dosis indometasin dan minyak jagung yang diberikan secara per oral adalah sebagai berikut:

Kebutuhan indometasin

$$15 \text{ mg/kg BB} \times 0,16 \text{ kg} = 2,4 \text{ mg/tikus}$$

Kebutuhan minyak jagung

$$\underline{2,4 \text{ mg}} \times 4 \text{ mL} = 0,213 \text{ mL/tikus}$$

45 mg

Campuran indometasin dengan minyak jagung di homogenkan menggunakan alat getar vorteks. Pemberian indometasin pada tikus dilakukan menggunakan sonde. Kemudian di inkubasi selama 24 jam. Hasil induksi indometasin dapat mengakibatkan kerusakan sel-sel pada daerah mukosa lambung dan usus.

4.7.3. Penentuan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*)

Penentuan dosis ekstrak daun kamboja (*Plumeria acuminata* L.) didasarkan pada penelitian Gupta (2006), yaitu 500 mg/kg BB – 2000 mg/kg BB yang merupakan dosis terapi anti inflamasi dan memiliki kemampuan hepatoprotektif. Penggunaan dosis diatas 2000 mg/kg BB diduga memiliki efek toksik. Oleh karena itu pada penelitian dosis yang digunakan adalah 500 mg/kg BB, 750 mg/kg BB dan dosis 1000 mg/kg BB sebagai dosis untuk terapi IBD.

Metode pembuatan ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.) didasarkan atas metode yang digunakan Gupta (2006), daun kamboja putih

(*Plumeria acuminata* L.) yang sudah kering dibuat bubuk dengan menggunakan penyaring No.40. Bubuk daun kamboja (*Plumeria acuminata* L.) kemudian ditimbang sesuai dosis 500 mg/kg BB (Kelompok C), 750 mg/kg BB (kelompok D) dan 1000 mg/kg BB (kelompok E). Selanjutnya bubuk daun kamboja di ekstrak menggunakan eter 60-80 °C selama 18 jam. Hasil ekstraksi tersebut kemudian di ekstrak kembali menggunakan metanol hingga terbentuk massa semisolid. Setelah itu dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring hingga didapatkan ekstrak daun kamboja dosis 500 mg/kgBB, 750 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB yang dipersiapkan setiap hari.

4.7.4. Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*)

Terapi ekstrak daun kamboja diberikan pada tikus kelompok C, D dan E. Metode pemberian volume terapi per oral tiap ekor tikus berdasarkan metode yang diterapkan Bekow and Baumans (2003) sebanyak 2 mL pada kelompok tikus (C) terapi ekstrak metanol *Plumeria acuminata* dosis 500 mg/kg BB, (D) ekstrak methanol *Plumeria acuminata* dosis 750 mg/kg BB dan (E) ekstrak metanol *Plumeria auminata* dengan dosis 1000 mg/kg BB yang diberikan 24 jam setelah induksi indometasin. Pemberian terapi ekstrak methanol *Plumeria acuminata* dilakukan selama 2 minggu berturut-turut (Rajendran, 2010).

4.7.5. Pengambilan Organ Duodenum

Pengambilan organ duodenum pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-16 setelah seluruh perlakuan dilakukan. Prosedur pertama yang dilakukan untuk pengambilan organ duodenum adalah hewan coba di dislokasi pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diletakkan secara ventrodorsal dan pembedahan dilakukan pada bagian perut. Kemudian diambil organ duodenumnya, diisolasi dan dipotong pada bagian tengah. Organ duodenum mula-mula dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9%, kemudian organ duodenum dimasukkan dalam larutan *Phospate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4 dan sebagian lagi dimasukkan pada larutan formaldehide (PFA) 10%.

4.7.6. Pembuatan Preparat Histopatologi

Sampel duodenum yang diperoleh, dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% bertujuan untuk menghilangkan darah. Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, embedding, sectioning, penempelan digelas objek serta pewarnaan.

Fiksasi untuk inaktivasi enzim degradasi dan mencegah kerusakan jaringan serta menjaga kontinuitas jaringan. Tahapan fiksasi yaitu dengan memasukkan jaringan ke dalam larutan PFA 4%, kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan proses dehidrasi. Proses dehidrasi diawali dengan merendam jaringan dalam larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat mulai dari 70% selama 24 jam, kemudian didalam etanol 80% selama 2 jam, dilanjutkan etanol 90%, sampai absolut

masing-masing membutuhkan waktu 20 menit. Proses dehidrasi berfungsi untuk menghilangkan sisa air yang ada di dalam jaringan.

Tahapan selanjutnya yaitu penjernihan, dengan cara jaringan dipindahkan dari alkohol absolut ke dalam larutan penjernihan yaitu xylol I (20 menit), xylol II (30 menit). Tahap penjernihan berfungsi untuk menghilangkan sisa etanol. Kemudian dilanjutkan dengan proses infiltrasi dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60 °C dan membiarkan parafin memasuki sela-sela jaringan.

Proses embedding dilakukan dengan mencelupkan jaringan dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam cetakan. Setelah beberapa saat parafin akan memadat. Pembuatan preparat dilakukan dengan memasukkan hasil embedding pada penjepit (block holder). Sectioning diawali dengan mengatur ketebalan irisan dengan ukuran $\pm 4-5 \mu\text{m}$ dengan menggunakan mikrotom. Hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat 38-40°C untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas objek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas hot plate 38-40°C sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40°C lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Junquiera dan Carneiro, 2007).

4.7.7. Prosedur Pewarnaan dengan *Hematoksilin Eosin* (HE)

Sediaan dideparafinisasi dengan *xylol* sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit. Kemudian dilakukan dehidrasi untuk dengan etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%) selama 5 menit. Kemudian dilanjutkan

dengan pencucian menggunakan akuades selama 5 menit. Langkah selanjutnya sediaan diwarnai dengan *Hematoxyline* selama 10 menit dan lalu dilanjutkan di bilas dengan air mengalir selama 30 menit lalu bilas dengan aquades selama 5 menit untuk menghilangkan sisa pewarnaan dan dineri pewarnaan eosin selama 5 menit. Kemudian direndam dengan akuades untuk menghilangkan kelebihan eosin. Prosedur berikutnya adalah dilakukan rehidrasi menggunakan etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) selama masing-masing 3 selama 5 menit. Sediaan yang sudah kering di *mounting* dengan *entelan* dan ditutup dengan *cover glass*. dilanjutkan pengamatan dengan mikroskop olympus dengan perbesaran 100 kali dan 400 kali (Bancroft, 2008).

4.7.8. Pengamatan Preparat Histopatologi Duodenum

Hasil pembuatan preparat histopatologi duodenum melalui pewarnaan hematoksilin-eosin (HE) diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 100x, kemudian perbesaran 400x untuk melihat adanya perubahan struktur komponen pada jaringan terutama pada bagian vili duodenum. Bagian vili yang diamati difokuskan pada sel epitel pada ujung vili. Hal ini dilakukan karena ujung vili merupakan tempat pertama yang terpapar oleh indometasin dimana kerusakan jaringan akan terlihat. Selain pengamatan terhadap struktur sel epitel, dilakukan juga pengamatan terhadap munculnya sel-sel inflamasi pada daerah vili duodenum.

4.7.9. Prosedur Pewarnaan dengan Metode Imunohistokimia

Pada pengamatan ekspresi COX-2 dengan imunohistokimia dipakai antibodi monoklonal anti COX-2 untuk mengidentifikasi ekspresi COX-2. Sediaan direndam dengan xylol sebanyak 2 kali selama 5 menit, dimasukan ke dalam etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) selama 5 menit dan dicuci PBS PH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian ditetesi dengan Hidrogen Peroksida selama 20 menit dan dicuci PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali.. Kemudian ditetesi BSA 1 % dalam PBS selama 30 menit dalam suhu ruang lalu dicuci selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer *anti Rat COX-2* selama 1 hari (24 jam) pada suhu 4°C kemudian dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali dan ditetesi dengan antibodi sekunder (*Goat anti rat Ig G biotin labeled*) dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 60 menit.

Proses selanjutnya sediaan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali, lalu ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin-Horseradish peroksidase*) lalu diinkubasi selama 30-60 menit. Proses berikutnya sediaan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diberi DAB (*diaminobenzidin*) selama 10 menit, kemudian sediaan dicuci dengan aquades selama 5 menit sebanyak 3 kali dan dilakukan *counterstain* dengan *Mayer's hematoxylyn* selama 5 menit. Selanjutnya dicuci dengan aquades lalu dikeringkan dan dilakukan *mounting* dengan menggunakan entellen sebagai pengawet dan memberikan warna cerah. Proses selanjutnya sediaan diamati pada daerah vili yang ditanda dengan

munculnya ekspresi COX-2 pada sitoplasma sel epitel duodenum dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400 kali. (Dabbs, 2014).

4.7.10. Pengamatan dan Perhitungan Area Ekspresi COX-2

Hasil preparat duodenum yang telah melalui pewarnaan immunohistokimia, kemudian difoto menggunakan mikroskop olympus dengan perbesaran 400 kali, kemudian dianalisis secara kuantitatif yang dilakukan menggunakan program *software immunoratio* dengan menghitung persentase area ekspresi COX-2 dengan pengamatan lima lapang pandang. Program *software immunoratio* bisa diakses secara bebas di web <http://153.1.200.58:8080/immunoratio/>. Ekspresi *cyclooxygenase* dianalisis melalui warna coklat oleh DAB yang terlihat saat dilakukan identifikasi preparat immunohistokimia. Warna coklat yang dipilih berdasarkan dengan ukuran yang tertera pada *software immunoratio* yang disesuaikan dengan ukuran sel yang ingin dilihat (Mungle dkk, 2016). Hasil persentase (%) didapatkan dari perbandingan warna coklat oleh DAB yang terpilih dengan total luas area seluruh lapang pandang (Tuominen dkk, 2010)

4.8. Analisa Data

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah ekspresi COX-dan histopatologi duodenum. Data yang diperoleh dari hasil pengukuran ekspresi COX-2 pada sampel dideskripsi dengan *software Immunoratio*, dianalisis dengan uji ANOVA dan dilakukan analisis lebih lanjut dengan uji *Tukey* ($\alpha = 0.05$) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dengan terapi

yang diberikan. Analisis statistik dengan menggunakan software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) 16.0. Gambaran histopatologi jaringan duodenum dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan kerusakan jaringan antar kelompok lain (Kusriningrum, 2008).



BAB 5 METODOLOGI PENELITIAN

5.1. Histopatologi Duodenum Tikus Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) setelah Diterapi dengan Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L.)

Pengamatan Histologi jaringan merupakan salah satu parameter untuk mengetahui keberhasilan suatu terapi. Dengan metode pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE) gambaran histologi duodenum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) Model IBD dapat diamati dibawah mikroskop dengan melihat adanya perubahan yang terjadi pada jaringan duodenum. Tiap perlakuan dilakukan pengamatan berupa perubahan histologi yang terjadi meliputi perubahan pada mukosa berupa erosi epitel, hiperplasia sel goblet, dan adanya infiltrasi sel radang yang menandai terjadinya inflamasi.

Hasil penelitian dari pengaruh terapi ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L.) terhadap gambaran histopatologi duodenum Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) menunjukkan adanya perbaikan pada struktur susunan epitel yang merata dan lebih teratur. Gambaran histologi duodenum pada masing-masing kelompok perlakuan ditampilkan pada Gambar 5.1 sampai dengan Gambar 5.5

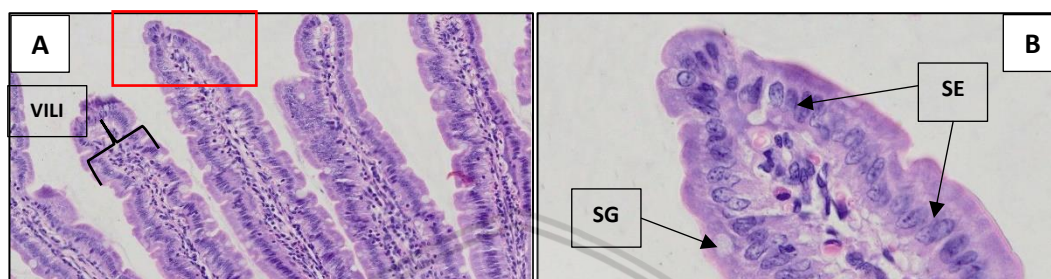
Gambaran histologi duodenum pada kelompok tikus kontrol/normal peresaran 100x (Gambar 5.1 A) menunjukkan struktur lapisan duodenum dan susunan epitel yang kompak, dimana memiliki vili panjang yang tersusun atas sel epitel silindris selapis yang teratur dan merata. Pada perbesaran 400x (Gambar 5.1B), kita dapat melihat susunan sel epitel yang rapi dan juga adanya sel goblet.

Hal ini sesuai penelitian Djumadi dkk (2008) yang menyatakan bahwa duodenum normal pada potongan melintang tersusun atas lapisan-lapisan (serosa, muskularis, submukosa, mukosa) teratur dan tampak struktur vili yang terdiri dari sel epitel selapis kolumnar tersusun kompak dengan inti bulat sampai oval.

Gambaran histologi duodenum pada kelompok tikus *inflammatory bowel disease* (IBD) perbesaran 100x (Gambar 5.2 A) menunjukkan terjadinya perubahan yang ditandai dengan struktur permukaan epitel yang kurang halus oleh adanya *space* intra-epitel, terjadi nekrosis, infiltrasi sel radang, dan vili duodenum mengalami erosi. Pada pembesaran 400x terlihat bahwasannya terdapat infiltrasi sel-sel radang dengan ditandai dengan munculnya sel neutrofil, limfosit, dan makrofag (Gambar 5.2 B) dan ada pula sel epitel yang mengalami nekrosis lequefaktif (Gambar 5.2 C). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Kara (2012), bahwa induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB selama 24 jam menyebabkan terjadinya IBD yang ditandai dengan kongesti pembuluh darah, erosi epitel dan infiltrasi sel radang.

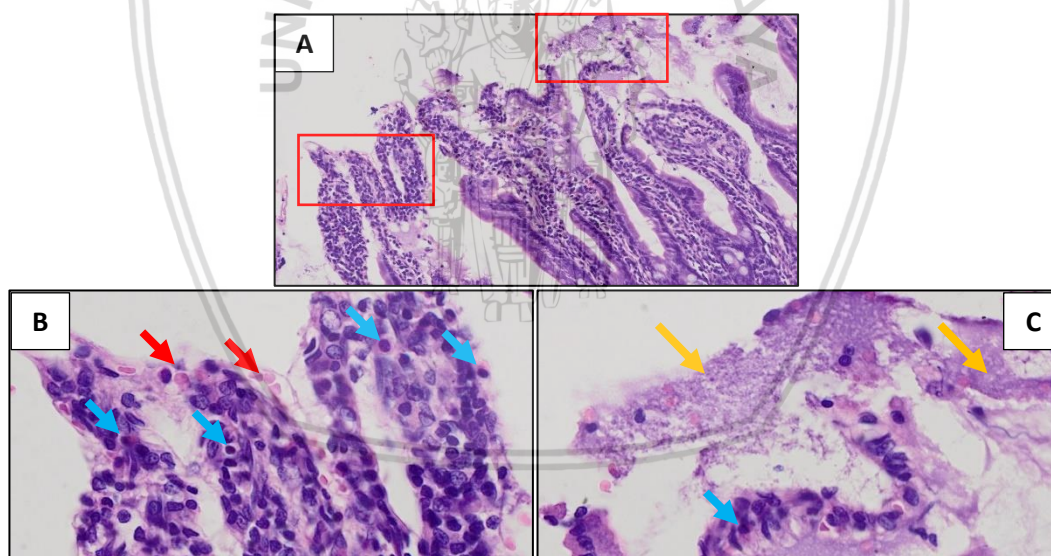
Inflamasi tersebut melibatkan sel inflamasi seperti neutrofil, limfosit, monosit dan makrofag, namun sel-sel radang yang mendominasi yaitu neutrofil. Hal tersebut dikarenakan pada fase awal proses peradangan, secara kimia sel yang pertama kali tertarik ke daerah inflamasi yaitu neutrofil. Neutrofil berperan dalam perbaikan mukosa. Satu jam setelah terjadi luka pada jaringan, neutrofil akan tertarik dan menjadi sel dominan pada jaringan yang luka selama dua hari pertama, dan jumlahnya akan meningkat pada hari kedua. Neutrofil akan memfagositosis sel debris dan membunuh bakteri, selain itu neutrofil juga akan mengeluarkan protease

untuk memecah jaringan yang rusak. Neutrofil dapat bertahan selama dua hari pada jaringan yang luka, selanjutnya neutrofil akan mengalami apoptosis dan di degradasi oleh makrofag (Martin and Leibovich, 2005).



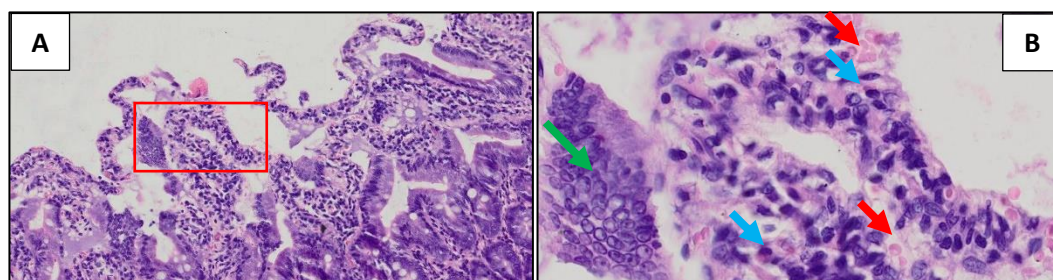
Gambar 5.1. Histologi vili organ duodenum tikus kontrol negatif/normal

Keterangan: (A) vili duodenum tikus kontrol/normal perbesaran 100x; (B) vili duodenum tikus perbesaran 400x, terdiri atas vili yang tersusun dari sel epitel columnar selapis (SE) dan sel goblet (SG).



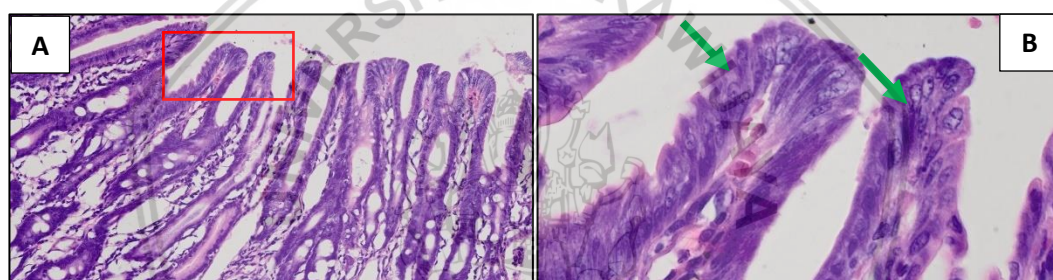
Gambar 5.2. Histopatologi vili organ duodenum tikus kontrol positif/IBD

Keterangan: (A) vili duodenum tikus IBD perbesaran 100x dengan struktur sel epitel pada vili mengalami radang dan terlihat mengalami nekrosis; (B) vili duodenum tikus perbesaran 400x, terlihat sel mengalami inflamasi ditandai dengan adanya sel-sel inflamasi (♣) dan mengalami hemoragi (♠); (C) vili duodenum tikus perbesaran 400x yang nampak mengalami nekrosis liquefaktif (♣).



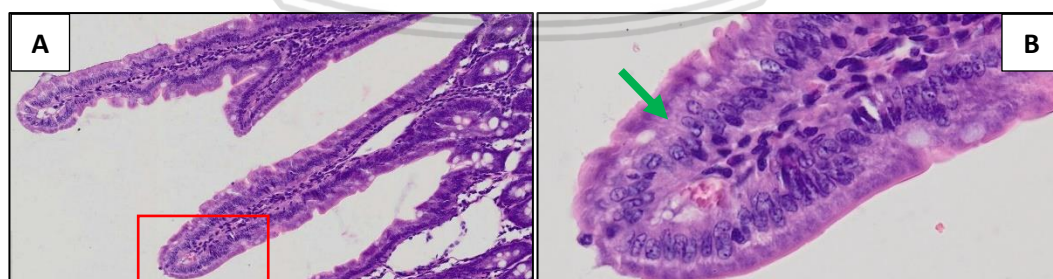
Gambar 5.3. Histopatologi vili organ duodenum tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja putih 500 mg/kg.

Keterangan: (A) vili duodenum tikus perbesaran 100x nampak masih terlihat adanya sel inflamasi dan ukuran vili duodenum memendek karena erosi sel; (B) vili duodenum tikus perbesaran 400x, masih terdapat jaringan yang mengalami inflamasi (↗) dan hemoragi (↗), namun, telah terlihat sel yang mengalami hiperplasia yang merupakan tanda dari regenerasi sel (↗).



Gambar 5.4. Histopatologi vili organ duodenum tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja putih 750 mg/kg.

Keterangan: (A) vili duodenum tikus perbesaran 100x yang sudah mulai menunjukkan perbaikan ditandai dengan vili yang memanjang namun lamina propia masih kosong; (B) vili duodenum tikus perbesaran 400x, nampak telah mengalami perbaikan terlihat dari sel epitel telah beregenerasi mengarah ke ujung vili (↗).



Gambar 5.5. Histopatologi vili organ duodenum tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja putih 1000 mg/kg.

Keterangan: (A) vili duodenum tikus perbesaran 100x; (B) vili duodenum tikus perbesaran 400x, terlihat sel-sel epitel pada vili yang mengalami regenerasi (↗) dan lamina propia mulai terisi oleh jaringan ikat.

Adanya stimulus baik eksogen maupun endogen yang menimbulkan inflamasi pada sel akan menyebabkan respon inflamasi yakni berupa reaksi kompleks pada jaringan yang mempunyai vaskularisasi. Inflamasi tersebut menyebabkan kerusakan permukaan mukosa duodenum dan pasokan oksigen yang mengangkut nutrisi menjadi berkurang (Kumar dkk, 2007). Pada saat terjadi rangsangan patologis baik berupa inflamasi atau kerusakan lainnya pada duodenum, kelenjar brunner yang terdapat pada lapisan submukosa akan lebih berperan dalam penyembuhan akibat rangsangan tersebut. Sel-sel mukus pada kelenjar brunner akan bertambah besar dan menghasilkan *epidermal growth factor* (EGF) yang tahan terhadap tripsin, kemotripsin dan pepsin. Cara kerja EGF yakni memodulasi sekresi asam lambung, menetralkan kerusakan jaringan dan mempengaruhi kecepatan proliferasi dalam kript duodenum (Macea *et al.*, 2006).

Pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) mampu memperbaiki gambaran histopatologi duodenum tikus IBD. Gambaran histologi duodenum (Gambar 5.3 A) pada kelompok terapi ekstrak daun kamboja dosis 500 mg/kgBB menunjukkan sedikit perubahan yang ditandai dengan berkurangnya tingkat keparahan epitel duodenum yang terlihat dari ukuran vili yang masih pendek namun tidak mengalami nekrosis seperti yang terjadi pada tikus IBD. Pada perbesaran 400x (Gambar 5.3 B), terlihat bahwa telah terjadi penurunan dari jumlah infiltrasi sel radang serta sel epitel telah beregenerasi ditandai dengan adanya bentukan hiperplasia sel epitel. Gambaran histologi duodenum (Gambar 5.4 A) pada kelompok terapi ekstrak daun kamboja dosis 750 mg/kgBB menunjukkan perbaikan pada ukuran vili yang mulai memanjang, namun pada daerah lamina

propia masih belum terisi sempurna. Pada perbesaran 400x (Gambar 5.4 B) struktur permukaan epitel duodenum telah mengalami regenerasi yang terlihat dari bentukan sel epitel yang condong mengarah ke ujung vili. Hal ini menandakan bahwa sel epitel beregenerasi bergerak dari kriptus menuju ujung vili. Selain itu, temuan lain bisa kita dapatkan adanya penurunan dari infiltrasi sel radang. Gambaran histologi duodenum pada kelompok terapi ekstrak daun kamboja dosis 1000 mg/kgBB dengan perbesaran 100x (Gambar 5.5 A) menunjukkan perbaikan yang lebih baik dibandingkan kelompok terapi sebelumnya, hal ini ditunjukkan dengan struktur permukaan epitel lebih halus dan teratur serta bagian lamina propria telah terisi dengan jaringan ikat serta kapiler pembuluh darah. Pada perbesaran 400x (Gambar 5.5 B) telah terlihat struktur vili yang sudah mendekati kelompok normal. Perbaikan histologi duodenum tersebut disebabkan oleh adanya pengaruh dari antiinflamasi dan antioksidan dalam ekstrak daun kamboja.

Menurut Okamoto dan Watanabe (2004), vili duodenum memiliki sel-sel progenitor yang disebut stem sel atau sel induk duodenum. Sel induk ini terletak di dasar kelenjar intestinal (kriptus) dan merupakan sumber sel-sel lainnya, baik di dalam kriptus maupun pada vili. Sel induk ini akan bermitosis untuk mempertahankan populasinya dan untuk membentuk sel epitel kolumnar, sel goblet, sel paneth dan sel enteroendokrin. Perkembangan sel induk menjadi sel epitel kolumnar dimulai ketika sel induk yang bergerak dari kriptus menuju ujung vilus dalam waktu 3 sampai 6 hari dan kemudian dilepaskan. Sel epitel duodenum akan mengalami pembaharuan yang tidak terputus-putus dengan migrasinya sel induk dari dasar kriptus menuju vili.

Kandungan Lupeol asetat di dalam ekstrak metanol daun kamboja putih mampu meningkatkan kadar antioksidan endogen dalam tubuh dan sebagai antiinflamasi sehingga radikal bebas dalam tubuh seimbang. Antiinflamasi yang ditimbulkan oleh lupeol asetat dapat menekan produksi PGE2, hal tersebut akan berpengaruh terhadap penurunan inflamasi sehingga mampu menekan terjadinya migrasi neutrofil ke jaringan (De Lima *et al.*, 2013). Berkurangnya migrasi neutrofil ke jaringan memberikan pengaruh terhadap rendahnya jumlah enzim proteolitik sehingga kerusakan sel dapat berkurang, selain itu, perbaikan sel juga didukung dengan adanya mekanisme regenerasi sel.

5.2. Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L.) Terhadap Ekspresi *Cyclooxygenase-2* pada Hewan Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Hasil Induksi Indometasin

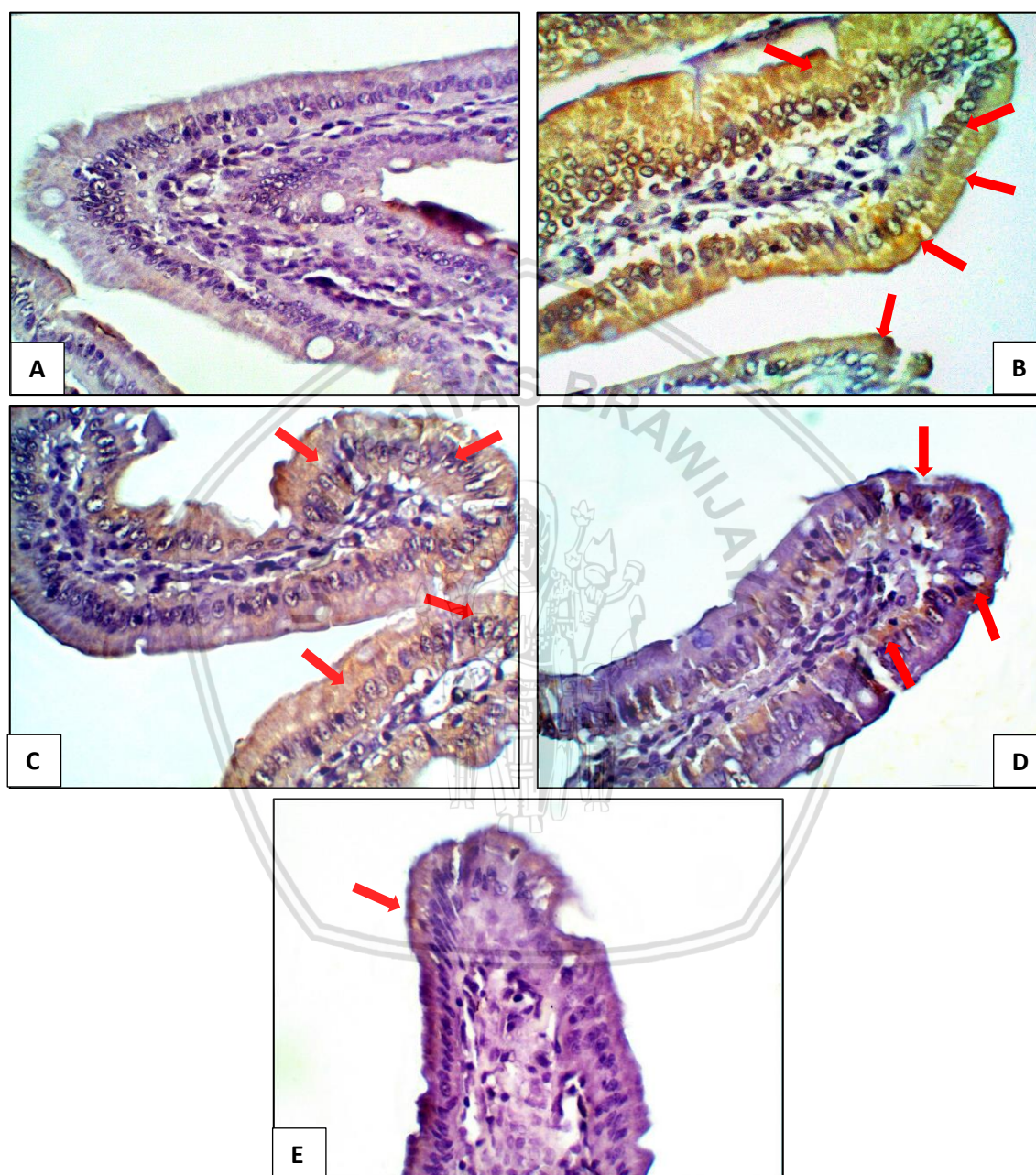
Pengaruh terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria accuminata* L.) terhadap ekspresi *Cyclooxygenase-2* (COX-2) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang diinduksi indometasin diamati menggunakan metode *Imunohistokimia* (IHK). *Imunohistokimia* adalah metode untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik di dalam suatu sel jaringan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi (Ab) dan antigen (Ag). Pengukuran ekspresi COX-2 menggunakan metode *imunohistokimia* dapat mengidentifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel, sehingga apabila terjadi peningkatan ekspresi COX-2 maka mengindikasikan adanya perubahan keadaan patologi dari suatu jaringan. Hasil pengamatan

menunjukkan adanya ekspresi COX-2 pada setiap perlakuan yang terlihat dengan munculnya warna coklat pada sitoplasma sel epitel duodenum, seperti yang ditunjukkan tanda panah merah pada **Gambar 5.6**.

Timbulnya warna coklat pada proses *Immunohistokimia* (IHK) dikarenakan adanya ikatan antara antigen dengan antibodi primer (*anti rat COX-2*) yang kemudian dilabeli oleh antibodi sekunder (*Goat Anti Rat biotin labeled*). Setelah terjadi ikatan dilakukan penambahan substrat *Diaminobenzidine* (DAB) yang berfungsi sebagai substrat kromogen, sehingga menghasilkan warna coklat pada jaringan Duodenum.

Cyclooxygenase-2 (COX-2) merupakan enzim penanda adanya inflamasi. Peningkatan ekspresi COX-2 mengindikasikan keadaan patologi suatu jaringan. Ekspresi COX-2 pada kelompok kontrol negatif ditunjukkan dengan intensitas rendah yang ditunjukkan dengan warna kecoklatan pada sitoplasma sel epitel duodenum (**Gambar 5.6.A**), pada tikus kelompok kontrol positif ekspresi COX-2 mengalami kenaikan intensitas warna coklat yang tersebar pada vili duodenum (**Gambar 5.6.B**). Ekspresi COX-2 pada setiap dosis terapi ekstrak metanol daun kamboja menunjukkan penurunan intensitas warna coklat yang terlihat pada kelompok tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja dosis 500 mg/kg BB (**Gambar 5.6.C**). Penurunan ekspresi COX-2 juga terjadi pada kelompok tikus dosis terapi 750 mg/kg BB (**Gambar 5.6.D**) dengan intensitas warna coklat yang lebih rendah dari pada kelompok tikus dosis terapi 500 mg/kg BB. Kelompok tikus yang menunjukkan penurunan

intensitas ekspresi COX-2 terendah terjadi pada kelompok tikus dosis terapi 1000 mg/kg (**Gambar 5.6.E**).



Gambar 5.6 Ekspresi *Cyclooxygenase-2* (COX-2) pada duodenum tikus perbesaran 400x.

Keterangan : (A) Tikus kontrol, (B) Tikus IBD, (C) Tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja putih 500 mg/kg BB, (D) ekstrak metanol daun kamboja putih 750 mg/kg BB, (E) ekstrak metanol daun kamboja putih 1000 mg/kg BB. Tanda panah merah (➡) menunjukkan ekspresi COX-2.

Analisis kuantitatif ekspresi COX-2 dilakukan menggunakan program *software immunoratio* dengan menghitung persentase area ekspresi COX-2 pada lima lapang pandang. Hasil pengamatan *imunoratio* tersebut dilanjutkan dengan uji statistik *One Way ANOVA (Analysis Of Variance)* menggunakan SPSS 16 yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan seperti yang disajikan pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Ekspresi COX-2 pada jaringan duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi Indometasin yang diterapi ekstrak metanol daun kamboja putih.

Kelompok	Persentase Area Ekspresi COX-2 (%)	Area Ekspresi COX-2 (%)	
		Peningkatan	Penurunan
A (Kontrol)	15,6 \pm 2,2 ^a	-	-
B (IBD)	59,5 \pm 5,3 ^d	292,8	-
C (Terapi 500 mg/kg BB)	47,3 \pm 3,8 ^c	-	20,61
D (Terapi 750 mg/kg BB)	28,8 \pm 4,8 ^b	-	51,16
E (Terapi 1000 mg/kg BB)	18,7 \pm 2,3 ^a	-	68,62

Keterangan: Notasi a, b, c dan d menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan nyata antar perlakuan.

Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada kelompok A (kontrol negatif) dengan kelompok B (kontrol positif), terjadi peningkatan ekspresi COX-2 yang signifikan ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Kelompok C terjadi penurunan ekspresi COX-2 yang signifikan dan berbeda nyata dengan kelompok A dan B. Kelompok D terjadi penurunan COX-2 yang signifikan dan berbeda nyata dengan kelompok A, B, C dan E. Kelompok E tidak berbeda signifikan dengan kelompok A (kontrol negatif). Setelah uji ANOVA

dilakukan, data dianalisis dengan uji tukey. Hasil uji tukey menunjukkan bahwa kelompok E dengan dosis terapi ekstrak metanol daun kamboja putih 1000 mg/kg BB merupakan dosis yang memberikan perlakuan terbaik.

Pada kelompok perlakuan A (kontrol negatif) menunjukkan rata-rata ekspresi COX-2 sebesar $(0,156 \pm 0,022)$. Kelompok perlakuan B (IBD) yang diinduksi menggunakan indometasin menunjukkan rata-rata ekspresi COX-2 sebesar $(0,595 \pm 0,053)$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol negatif yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Ekspresi COX-2 tersebut mengalami peningkatan sebesar 292,8% apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini disebabkan karena pemberian indometasin 15 mg/kg BB secara peroral akan langsung menuju target yang dituju yaitu saluran pencernaan sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi pada saluran cerna sehingga dapat memicu munculnya COX-2 (Tanaka *et al.*, 2004).

Pada jaringan duodenum tikus kelompok C yang diterapi ekstrak methanol daun kamboja putih dengan dosis 500 mg/kg BB mampu menurunkan ekspresi COX-2 sebesar 20,47% $(0,473 \pm 0,038)$ pada kelompok D yang diterapi dosis 750 mg/kg BB mengalami penurunan ekspresi COX-2 lebih besar 51,16% $(0,288 \pm 0,048)$ dan tikus kelompok E yang diberikan terapi dosis 1000 mg/kg BB mengalami penurunan ekspresi paling besar 68,62% $(0,187 \pm 0,023)$ dari kelompok B (kontrol positif). Hal ini menunjukkan bahwa setiap terapi ekstrak metanol daun kamboja putih memiliki efek penurunan ekspresi COX-2 organ duodenum. Pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja putih dosis 1000 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi COX-2 pada tikus ekstrak

metanol daun kamboja putih dari pada dosis 500 mg/kg BB dan dosis 750 mg/kg BB.

Penurunan presentase area ekspresi COX-2 terjadi karena kandungan lupeol asetat dalam ekstrak metanol daun kamboja putih dapat bertindak sebagai antiinflamasi. Pada Uji LCMS yang dilakukan, diketahui bahwa ekstrak metanol daun kamboja putih yang digunakan sebagai terapi terhadap tikus yang mengalami IBD terdapat kandungan *lupeol acetat* sebanyak 468 g/mol. Kandungan *lupeol acetat* tersebut merupakan kandungan yang paling banyak dibandingkan dengan senyawa *terpenoid* lainnya. *Lupeol acetat* merupakan turunan dari *Terpenoid*. Beberapa turunan *Terpenoid* yang berhasil teridentifikasi berdasarkan berat molekulnya adalah **(Lampiran 13)**:

- 1) Stigmast-7-enol: Molar mass 414 g/mol
- 2) Ursolic acid: Molar mass 456 g/mol
- 3) Lupeol acetat: Molar mass 468 g/mol
- 4) Lupeol carboxylic acid: Molar mass 426 g/mol

Lupeol Acetat yang terkandung dalam daun kamboja putih dapat bertindak sebagai antiinflamasi dengan cara menghambat enzim COX-2 sehingga prostaglandin tidak terbentuk. Kemampuan lupeol asetat dalam menghambat sitokin proinflamasi inilah yang dapat menyebabkan berkurangnya keparahan inflamasi sehingga kerusakan sel-sel pada duodenum dapat berkurang kemudian dapat memperbaiki gambaran histologi pada jaringan duodenum

BAB 6 PENUTUP

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

- 1 Pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) pada tikus model IBD dapat memperbaiki gambaran histopatologi sel epitel duodenum dan menurunkan infiltrasi sel radang.
- 2 Pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) pada tikus model IBD dapat menurunkan persentase area ekspresi COX-2 pada kondisi IBD, yaitu dengan dosis terbaik ekstrak metanol daun kamboja putih adalah 1000 mg/kg BB sebesar 68,62%.

6.2. Saran

Diperlukan pengembangan mengenai pemanfaatan ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.) sebagai terapi terhadap penyakit *inflammatory bowel disease* (IBD) pada *pet animal*.

DAFTAR PUSTAKA

- Asni, E. 2009. *Pengaruh Hipoksia Berkelanjutan Terhadap Kadar Malondialdehid, Glutation Tereuksi, dan Aktivitas Katalase Ginjal Tikus*, *Majalah Kedokteran Indonesia*, 59(12): 595-600.
- Aulanni'am., A. Roosdiana, and N.L. Rahmah. 2012. *The Potency of Sargassum duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in Rattus norvegicus*. *Journal of Life Sciences* 6 : 144-154.
- Bekow, C.A and V. Baumans. 2003. *Common Non Surgical Techniques and Procedures*. In Hau J and Van Housier GL, editors *Handbook of Laboratory Animal Science*. CRC Press. 351-390.
- Bogdanske, John J., Scott Hubbard-Van Stelle, Margaret Rankin Rilry, Beth M. Schiffman. 2010. *Laboratory Rat Procedural Techniques Manual and DVD*. CPR Press Taylor and Francis Group. Florida p.67-68
- Bures J, J Pejchal, J Kvetina, A Tichý, S Rejchrt, M Kunes, M Kopacova. 2011. *Morphometric analysis of the porcine gastrointestinal tract in a 10-day high-dose indomethacin administration with or without probiotic bacteria Escherichia coli Nissle 1917*. *Hum Exp Toxicol*. Dec;30(12):1955-1962.
- Cheng, Jian and Xiao-Ming Fan. 2013. *Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development and progression*. *World J Gastroenterol*. 2013 Nov 14; 19(42): 7361–7368.
- Danastri, I Gusti Ayu Mahaprani dan Ida Bagus Darma Putra. 2011. *INFLAMMATORY BOWEL DISEASE*. Divisi Bedah Digestif/SMF Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
- De Lima, F.O, V. Alves, J.M. Barbosa Filho, JR. Almeida, LC. Rodrigues, M.B. Soares, and C.F. Villarreal. 2013. *Antinociceptive Effect of Lupeol acetat: Evidence for a Role Cytokines Inhibition*. *Phytother. Res*.27:1557-1563.
- Devprakash, R. Tembare, S.Gurav, S.G.P.Kumar, T.M. Tamizh. 2011. *An Review Of Phytochemical Constituents & Pharmacological Activity Of Plumeria sp.*. *International Journal Of Current Pharmaceutical Reasearch*. Deptt of Pharmaceutical Chemistry, Bharathi college of pharmacy: India
- Eroschenko v. 2003. *diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations* ed 9 terjemahan. Tambayong J ed. Jakarta : EGC ; p.196-197
- Faiz, U, and D. Moffat. 2004. *At a glance series anatomi*. Rahmania A ed. Jakarta: Erlangga; p, 34-37

- Fawcett, D and B. William. 2002. A Textbook Of Histology ed 12 Terjemahan. Tambayong J ed. Jakarta: EGC ; p.552-569
- Furst, D.E., and R.W. Ulrich. 2007. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, & Drugs Used In Gout. In: Katzung, B.G., ed. *Basic and Clinical Pharmacology*. 10th ed. Singapore: The McGraw-Hill Company, 591-592.
- Hankenson, F. Claire. 2014. *Critical Care Management for Laboratory Mice and Rats*. CRC Press. p.113-115
- Gradel KO, HL. Nielsen, HC. Schonheyder, T. Ejlersen, B. Kristensen and H. Nielsen. 2009. *Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis.*; 137: 495-501[PMID: 19361507 DOI: 10.1053 j.gastro.2009.04.001].
- Gupta M, UK. Mazumder, P. Gomathi and V. Thamil. 2006. *Anti-inflammatory Evaluation Of Leaves Of Plumeria Acuminata*. BMC Complementary And Alternative Medicine; 1472-6882.
- Guyton, A, and E.H. John. 2007. Textbook of medical physiology ed 11 terjemahan. Setiawan I ed. Jakarta: EGC; p. 814-859
- Junquiera L.C, J. Carneiro and R.O. Kelley. 2003. *Basic Histology*. 10th edition, Washington, Lange: 316-23.
- Kathrani, A., D. Werling and K. Allenspach, 2011. *Canine breeds at high risk of developing inflammatory bowel disease in the south-eastern UK. Veterinary Record*. 169(24):635.
- Keenan JJ, CR. Beaugie, B. Jasmann, HC. Potter, JA. Collett and FA. Frizelle. *Helicobacter species in the human colon. Colorectal Dis* 2010; 12: 48-53 [PMID: 20050183 DOI: 10.1111/j.1463-1318.2008.01672.x].
- Klein, A. and R. Eliakim. 2010. *Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Inflammatory Bowel Disease. Departement of Gastroenterology. Rambam Health Care Campus, Haifa. Pharmaceuticals*. 3, 1084-1029;
- Konturek PC, J. Kania, JW. Konturek, A. Nikiforuk, SJ. Konturek and EG. Hahn. 2003. *H. pylori infection, atrophic gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PGE2 and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis*. Med Sci Monit. 9: SR53-60. Chem 276: 7614-7620.
- Kumar V, RS Cotran, dan SL Robbins. 2007. *Buku ajar patologi* .7 nd ed, Vol. 2.: Penerbit. Buku Kedokteran EGC. Jakarta

- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya
- Laudanno, O.M., L. Vasconcelos, J. Catalana, and J.A. Cesolari. 2006. *Anti-Inflammatory Effect of Bioflora Probiotic Administered Orally or Subcutaneously with Live or Dead Bacteria*. *Digestive Diseases Sciences*. 51:2180–2183.
- Li H, Edin ML, Bradbury JA, Graves JP, DeGraff LM, Gruzdev A, Cheng J, Dackor RT, Wang PM, Bortner CD, Garantziotis S, Jetten AM, Zeldin DC. 2013 *Cyclooxygenase-2 inhibits T helper cell type 9 differentiation during allergic lung inflammation via down-regulation of IL-17RB*. *Am J Respir Crit Care Med*. Apr 15;187(8):812-22.
- Lucetti, D.L., M.B. Anne, H.N. Veras, dan A.H. Silva. 2010. Anti-inflammatory Effect and Possible Mechanism of Action of Lupeol Acetate Isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *Journal of Inflammation*. Brazil: Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará.
- Macea, M. M. I., J. R. Macea dan Fregnani T. J. H. G. 2006. *Quantitative Study of Brunner's Glands in the Human Duodenal Submucosa*. *Int. J. Morphol*. 24(1):7-12.
- Martin, P and SJ, Leibovich. 2005. *Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly*. *Trends in Cell Biology* 15 (11): 599–607. doi:10.1016/j.tcb.2005.09.002.
- Matsui, H., O. Shimokawa., T. Kaneko., Y. Nagano., K. Rai, and I. Hyodo. 2011. *The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine*. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* Vol. 48(2): 107–111.
- Mungle T., Suman T., Indu A., Bijan., Sanjit., Rosima., Sanjoy., Asok K.M., Chandan C. 2016. *Automated characterization and counting of ki-67 protein for breast cancer prognosis: a quantitative immunohistochemistry approach*. *Computer Methods and Program in Biomedicine*. 18:146-169
- Okamoto, R dan M. Watanabe. 2004. *Molecular and Clinical Basis Gastrointestinal Epithelia*. *J. Gastroenterol*, 39:1-6.
- Paiotti., RA, DA. Neto, SJ. Ribeiro. Miszputen and M, Franco. 2014. *The Role of COX-2 Inhibitor on Experimentl Colitis. Inflammatory Bowel Disease-Advance In Pathogenesis and Management*. Brasil.

- Pand RR and BN. Mehrotra. 2006. *Compendium of Indian Medicinal Plants*. Volume 2, CDRI, Lucknow & NISCAIR, New Delhi: 320-322.
- Rahardjani dan K. Budi. 2010. *Hubungan antara Malondialdehyde (MDA) dengan Hasil Luaran Sepsis Neonatorum*. *Jurnal Sari Pediatri*, 12(2): 82-87.
- Rajendran, R, S. Hemalatha, K. Akasakalai and R.M. Sundaran. 2010. *Hepatoprotective activity of Mimosa Pudica Leave extract againsts Carbontetrachloride Induced Toxicity*. *Jurnal of Natural Product*, (2);116-122.
- Rishi, A. 2017. *Anus and perianal area Inflammatory diseases: Crohn's disease*. Pathology Outlines Inc.
- Shinde P. R , PS. Patil and VA. Bairagi. 2014. *Phytopharmacological Review of Plumeria species*. *Sch. Acad. J. Pharm.*, 2014; 3(2): 217-227. ISSN 2320-4206.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier-Saunders.p. United States of America.
- Sparkes H. 2010. *Long Term Use of NSAID in cats*. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 12, 521-538.
- Takeuchi K, A. Tanaka, S. Kato, K. Amagase and H. Satoh. 2010. *Roles of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage*. *Clin Chim Acta*; 411: 459-466
- Takeuchi, K. 2012. *Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: Importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility*. *World J Gastroenterol*. doi:10.3748/wjg.v18.i18.2147.
- Tanaka A, H. Araki, S. Hase, Y. Komoike and T. Koji. 2004. *Up-regulation of COX-2 by inhibition of COX-1 in the rat: a key to NSAID-induced gastric injury*. *Aliment Pharmacol Ther*; 16 Suppl 2: 90-101
- Tanaka A, H. Araki, Y. Komoike, S. Hase and T. Koji. 2005. *Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs*. *J Physiol Paris*; 95: 21-27.
- Tuominen, VJ., Ruotoistenmaki S., Viitanen A, Jumppanen M., Isola J. 2012. *Immunoratio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and ki-67 Breast cancer res*. 12(4):138-140

Wilmana, P.F. dan S.G. Gan. 2007. *Analgesik-Antipiretik Antiinflamasi Nonsteroid dan Obat Gangguan Sendi lainnya*. Dalam Gan, S.G., Editor. Farmakologi dan Terapi. Edisi 5. Jakarta: Gaya Baru, 230-240.






Lampiran 1. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman

	<p>KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM JURUSAN BIOLOGI LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN PERKEMBANGAN TUMBUHAN Jalan Veteran, Malang 65145, Indonesia, Telepon/Fax.: +62-341-575841, http://biologi.ub.ac.id</p>
<p><u>SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI</u></p>	
<p>No : No. 0149/Takso.Identifikasi/03/2014</p>	
<p>Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:</p>	
Nama	: Eni Wulandari (NIM 115130100111052) Navy Linggar H. A. (NIM 115130100111063) Gilang Siwi P. (NIM 115130100111051) Geta Darantika (NIM 115130101111059) Vetri Handayani (NIM 115130113111005)
Instansi	: Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya
<p>Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume II, halaman 225, diidentifikasi sebagai:</p>	
Familia	: Apocynaceae
Genus	: <i>Plumeria</i>
Species	: <i>Plumeria acuminata</i> W. T. Ait.
Nama lokal	: Kamboja
<p>Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.</p>	
<p>Malang, 3 Oktober 2014</p>	
<p>a.n. Kepala Laboratorium Pelaksana Harian</p>	
<p>  Dr. Jati Batoro, M.Si NIP. 19570425.198601.1.001</p>	

Lampiran 2. Serifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**



**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
“ETHICAL CLEARENCE”**

No:305-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**
**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL	: PENGARUH TERAPI EKSTRAK DAUN KAMBOJA PUTIH (<i>Plumonia oeuminata L.</i>) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN GAMBARAN HISTOPATOLOGI LAMBUNG TIKUS (<i>Rattus norvegicus</i>) HASIL INDUKSI INDOMETASIN
PENELITI	: VETRI HANDAYANI
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK

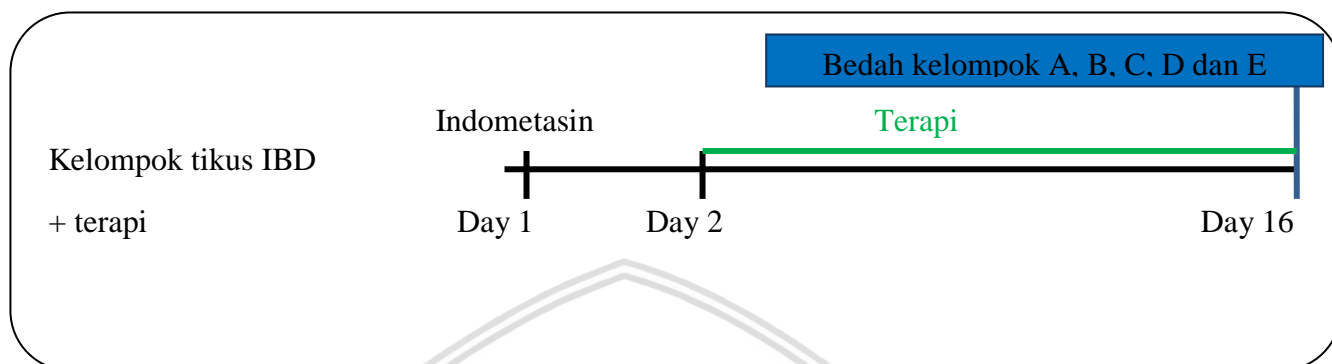
Malang, 17 Maret 2015
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 3. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

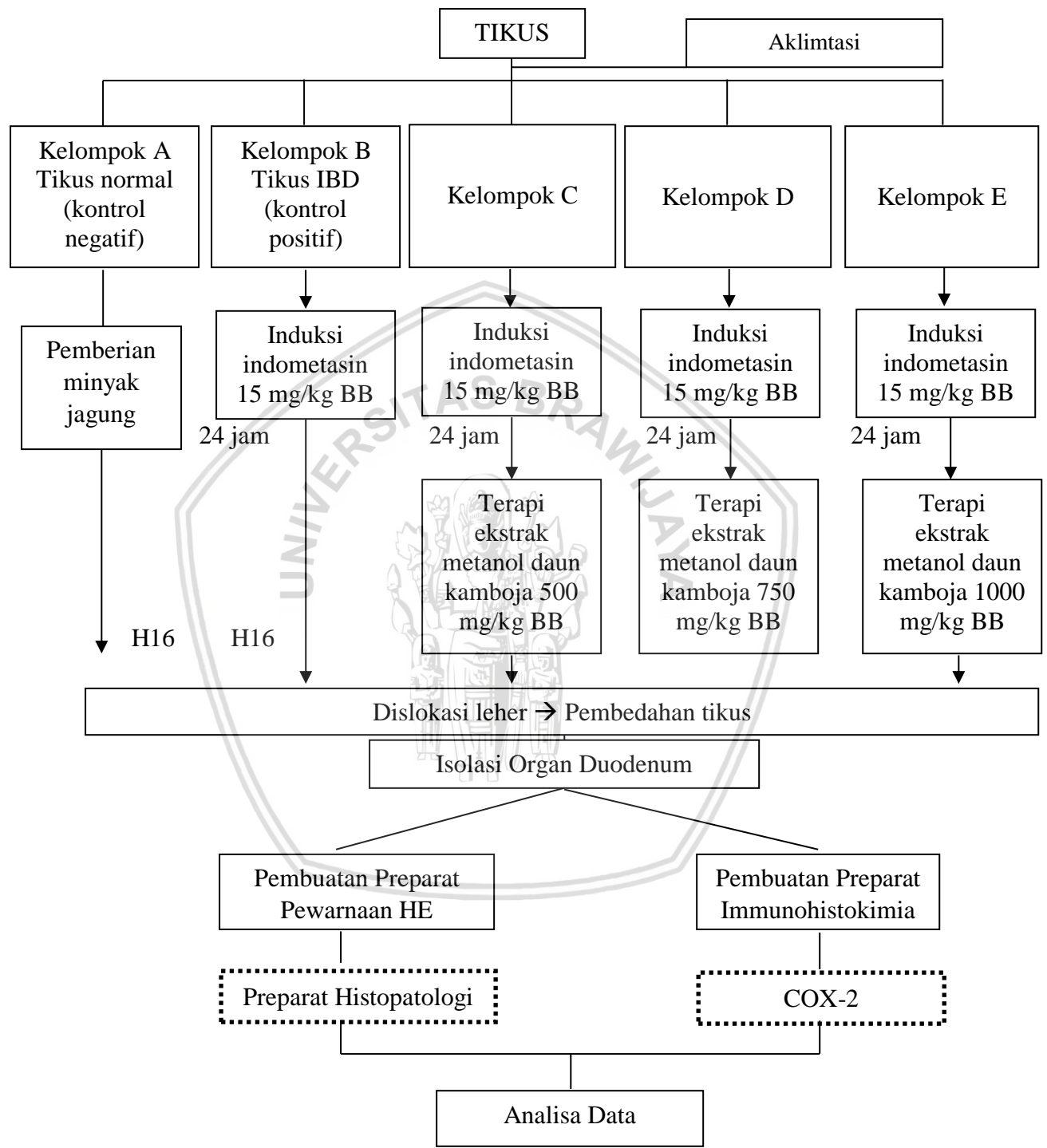
A. Rancangan Perlakuan




Keterangan:

1. Induksi indometasin dilakukan secara per oral dengan dosis 15 mg/kg BB dengan pelarut minyak jagung.
2. Pada hari ke-2 sampai hari ke-15 tikus kelompok C, D dan E diberikan terapi ekstrak metanol daun kamboja (*Plumeria acuminata L.*) dengan dosis 500 mg, 750 mg dan 1000 mg.
3. Pada hari ke-16 dilakukan pembedahan tikus kelompok C, D dan E untuk mengisolasi organ untuk pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE dan melihat ekspresi COX-2 dengan menggunakan uji IHK.

B. Kerangka Operasional



Keterangan :

 : Parameter yang diamati

Lampiran 4. Perhitungan Dosis Indometasin

Dosis indometasin yang diberikan yaitu 15 mg/kg BB (Aulani'am, 2012). Rata- rata berat badan tikus adalah 200 gram. Kebutuhan indometasin untuk per ekor tikus yaitu:

$$\begin{aligned}\text{Dosis indometasin per ekor tikus} &= 15 \text{ mg/kg BB} \times 0,20 \text{ kg} \\ &= 3 \text{ mg.}\end{aligned}$$

Jadi, dosis indometasin yang diperlukan untuk 16 ekor tikus adalah:

$$\begin{aligned}\text{Dosis indometasin untuk 16 ekor tikus} &= 16 \times 3 \text{ mg} \\ &= 48 \text{ mg.}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Pengeceran dengan minyak jagung yaitu sebanyak} &= 48 \text{ mg} / 45 \text{ mg} \times 4 \text{ mL} \\ &= 4,3 \text{ mL} = 4300 \mu\text{L}\end{aligned}$$

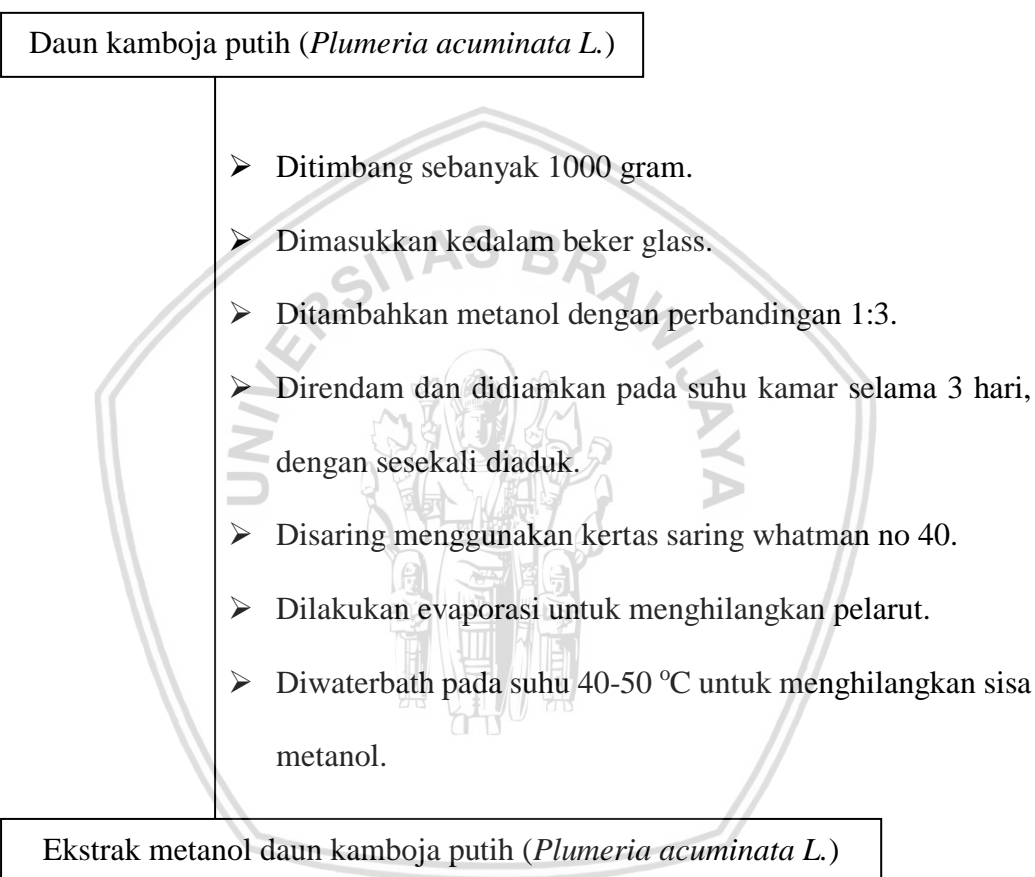
Jadi, indometasin yang diperlukan untuk 16 ekor tikus yaitu sebanyak 48 mg. selanjutnya diencerkan dengan minyak jagung dengan hasil akhir 4,3 mL untuk 16 ekor tikus. Induksi indometasin yang diperlukan untuk per ekor tikus yaitu 0,27 mL.

Lampiran 5. Penentuan dosis dan pembuatan ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata L.*)

Dosis eksperimental ditentukan berdasarkan penelitian Gupta (2006) yaitu sebesar 500 mg/kg BB, 750 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB. Hal ini dikarenakan dosis yang sering digunakan dalam penelitian menggunakan

ekstrak metanol daun kamboja putih antara 500 mg/kg BB sampai 2000 mg/kg BB.

Prosedur pembuatan ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.)



Perhitungan Dosis Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata L.*)

Kelompok C (Dosis Terapi 500 mg/ kg BB)

Perhitungan untuk dosis 500 mg/kg BB

Diketahui: - Rata-rata berat badan tikus adalah 200 gram.

$$\text{Dihitung:} = \frac{200}{1000} \text{ kg} \times 500 \text{ mg/kg}$$

$$= 100 \text{ mg berat kering daun kamboja putih/ ekor tikus.}$$

Perhitungan berat kering daun kamboja putih untuk satu kelompok perlakuan terapi

500 mg/kg BB.

Diketahui :

- Banyaknya daun kamboja putih yang dibutuhkan per ekor adalah 100 mg.
- Jumlah kelompok terapi 500 mg/kg BB adalah 4 ekor.

Dihitung :

Berat kering daun kamboja putih = jumlah pemberian/ekor x jumlah tikus

$$= 100 \text{ mg/ ekor/ hari} \times 4$$

$$= 400 \text{ mg} \times 14$$

$$= 5600 \text{ mg}$$

$$= 5,6 \text{ gram}$$

Diambil ekstrak metanol daun kamboja putih sebanyak 5,6 gram ditambahkan dengan 56 mL aquades, diberikan setiap hari selama dua minggu sebanyak 1 mL/ ekor/ hari.

Kelompok D (Dosis Terapi 750 mg/ kg BB)

Perhitungan untuk dosis 750 mg/kg BB

Diketahui : - Rata-rata berat badan tikus adalah 200 gram.

$$\text{Dihitung:} = \frac{200}{1000} \text{ kg} \times 750 \text{ mg/kg}$$

$$= 150 \text{ mg berat kering daun kamboja putih/ ekor tikus.}$$

Perhitungan berat kering daun kamboja putih untuk satu kelompok perlakuan terapi 750 mg/kg BB.

Diketahui :

- Banyaknya daun kamboja putih yang dibutuhkan per ekor adalah 150 mg.
- Jumlah kelompok terapi 750 mg/kg BB adalah 4 ekor.

Dihitung :

Berat kering daun kamboja putih = jumlah pemberian/ekor x jumlah tikus

$$= 150 \text{ mg/ ekor/ hari} \times 4$$

$$= 600 \text{ mg/ 4 ekor tikus} \times 14$$

$$= 8400 \text{ mg}$$

$$= 8,4 \text{ gram}$$

Diambil ekstrak metanol daun kamboja putih sebanyak 8,4 gram ditambahkan dengan 56 mL aquades, diberikan setiap hari selama dua minggu sebanyak 1 mL/ekor/ hari.

Kelompok E (Dosis Terapi 1000 mg/ kg BB)

Perhitungan untuk dosis 1000 mg/kg BB

Diketahui : - Rata-rata berat badan tikus adalah 200 gram.

$$\text{Dihitung:} = \frac{200}{1000} \text{ kg} \times 1000 \text{ mg/kg}$$

$$= 200 \text{ mg berat kering daun kamboja putih/ ekor tikus.}$$

Perhitungan berat kering daun kamboja putih untuk satu kelompok perlakuan terapi 1000 mg/kg BB.

Diketahui :

- Banyaknya daun kamboja putih yang dibutuhkan per ekor adalah 200 mg.
- Jumlah kelompok terapi 1000 mg/kg BB adalah 4 ekor.

Dihitung :

Berat kering daun Kamboja Putih = jumlah pemberian/ekor x jumlah tikus

$$= 200 \text{ mg/ ekor/ hari} \times 4$$

$$= 800 \text{ mg} \times 14$$

$$= 11200 \text{ mg}$$

$$= 11,2 \text{ gram}$$

Diambil ekstrak metanol daun kamboja putih sebanyak 5,6 gram ditambahkan dengan 56 mL aquades, diberikan setiap hari selama dua minggu sebanyak 1 mL/ekor/ hari.

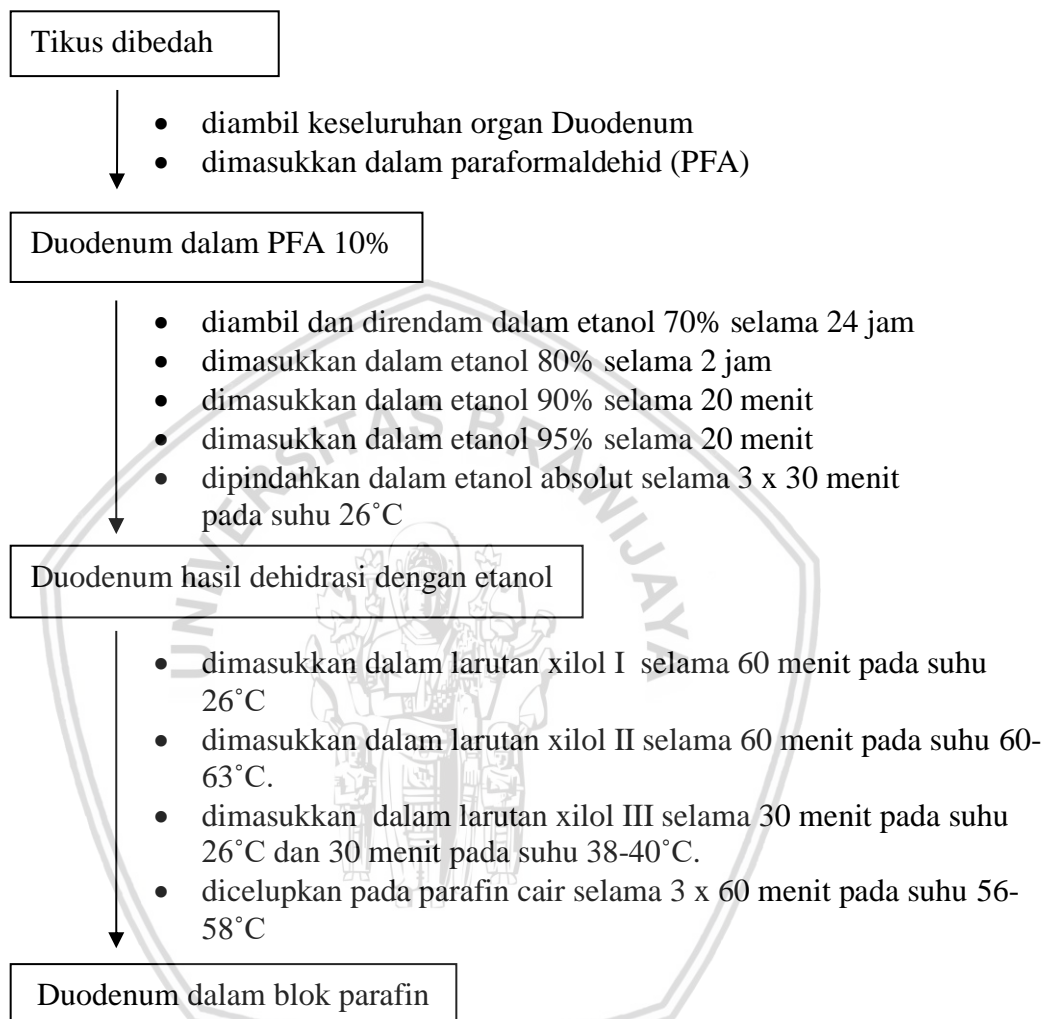
Lampiran 6. Komposisi Larutan

Tabel L 6.1. Komposisi Larutan

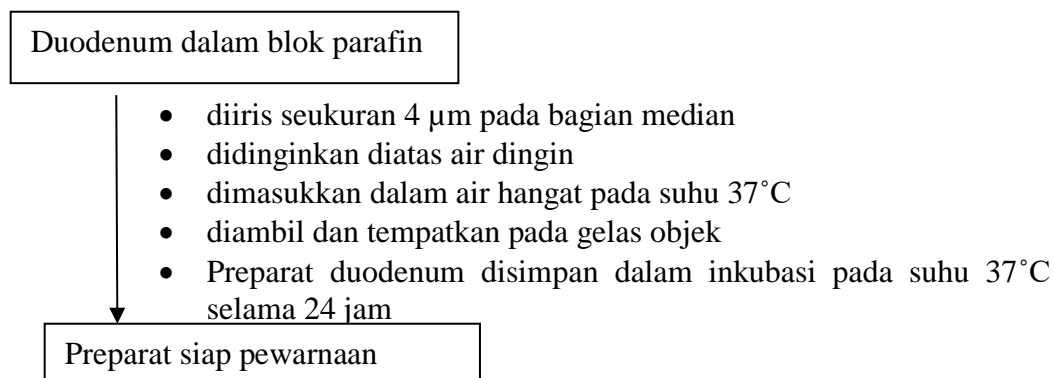
No.	Larutan	Bahan- bahan
1.	100 mL NaCl fisiologis 0,9 %	4,5 gram garam NaCl Aquades
2.	PBS pH 7,4	0,2 gram KCl 0,2 gram KH_2PO_4 8 gram NaCl 2,16 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 gram KCl 0,2 gram KH_2PO_4 8 gram NaCl 2,16 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
3.	TCA 10%	TCA 10 g Akuades 100 mL
4.	Na-Thio 1%	Asam thiobarbiturat 0,868 g NaOH 0,241 Akuades 100 mL
5.	HCl 1 N	HCL 37 % 7,780 mL Akuades 100 mL
6.	Buffer formalin 10%	100 mL formaldehida 40 % 4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6,5 g Na_2HPO_4 900 mL Akuades

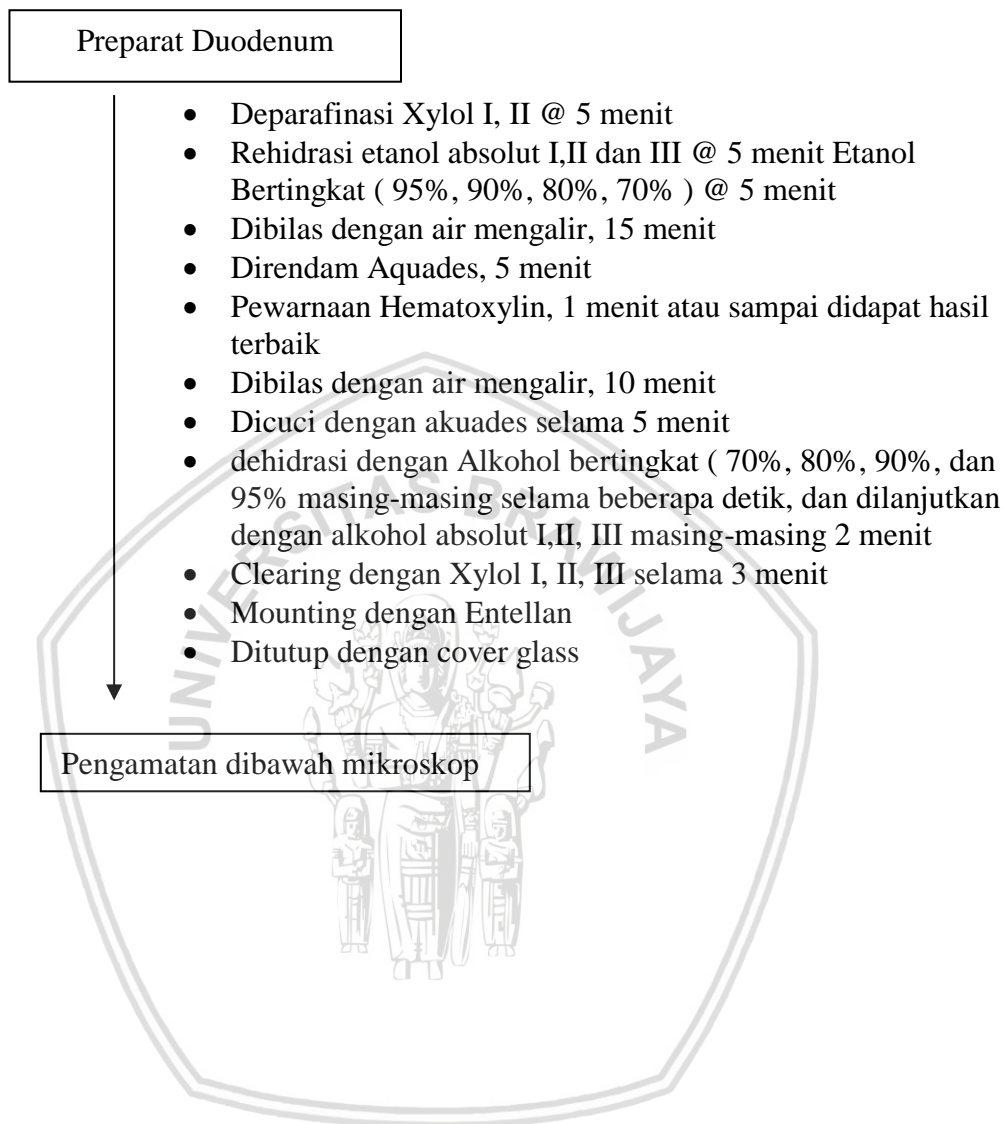
Lampiran 7. Pembuatan Preparat Histopatologi Duodenum

7.1 Embedding Duodenum

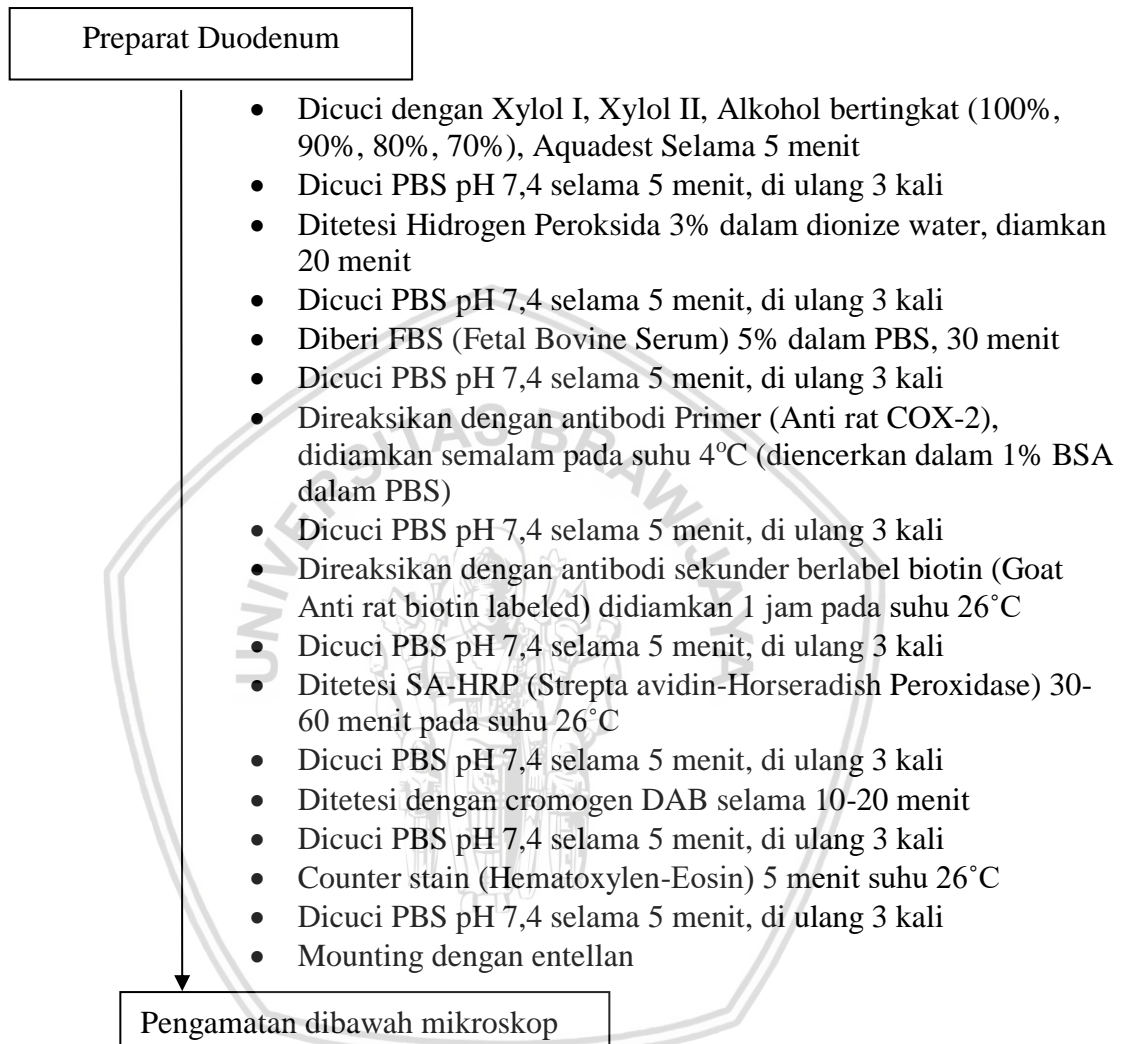


7.2 Pembuatan Preparat Organ Duodenum



Lampiran 8. Pembuatan Preparat dengan Pewarnaan Hematoxylin Eosin

Lampiran 9. Pembuatan Preparat dengan Teknik Imunohistokimia COX-2



Lampiran 10. Perhitungan Ekspresi COX-2

Tabel L10.1. Data Ekspresi COX-2

Kelompok Perlakuan	Tikus				Rataan Ekspresi COX-2
	1	2	3	4	
Kontrol	0,138	0,169	0,172	0,127	0,1515
IBD	0,568	0,537	0,62	0,656	0,5952
Terapi 500	0,479	0,417	0,493	0,501	0,4725
Terapi 750	0,305	0,239	0,262	0,347	0,2883
Terapi 1000	0,18	0,199	0,158	0,21	0,1868

Lampiran 11. Presentasi Peningkatan dan Penurunan Ekspresi COX-2

Kelompok Kontrol

$$\begin{aligned}
 \text{Peningkatan ekspresi COX-2 (\%)} &= \frac{\text{Rataan IBD} - \text{Rataan Kontrol}}{\text{Rataan Kontrol}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,5952 - 0,1515}{0,1515} \times 100\% \\
 &= 292,87\%
 \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 500 mg/kgBB

$$\begin{aligned}
 \text{Penurunan ekspresi COX-2 (\%)} &= \frac{\text{Rataan IBD} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan IBD}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,5952 - 0,4725}{0,5952} \times 100\% \\
 &= 20,61\%
 \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 750 mg/kgBB

$$\begin{aligned}
 \text{Penurunan ekspresi COX-2 (\%)} &= \frac{\text{Rataan IBD} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan IBD}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,5952 - 0,2883}{0,5952} \times 100\% \\
 &= 51,16\%
 \end{aligned}$$

Kelompok Terapi 1000 mg/kgBB

$$\begin{aligned}
 \text{Penurunan ekspresi COX-2 (\%)} &= \frac{\text{Rataan IBD} - \text{Rataan Terapi}}{\text{Rataan IBD}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,5952 - 0,1868}{0,5952} \times 100\% \\
 &= 68,62\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 12. Hasil Uji Statistik Ekspresi COX-2

Tabel 12.1 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

COX2

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.891	4	15	.164

Tabel 12.2 Uji Statistik ANOVA

ANOVA

COX2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5775.923	4	1443.981	95.366	.000
Within Groups	227.122	15	15.141		
Total	6003.046	19			

Tabel 12.3 Peemberian Notasi Pada Uji BNJ

COX2

Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
1	4	15.1500			
5	4	18.6750			
4	4		28.8250		
3	4			47.2500	
2	4				59.5250
Sig.		.706	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Tabel 12.4 Uji Lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ)

Multiple Comparisons

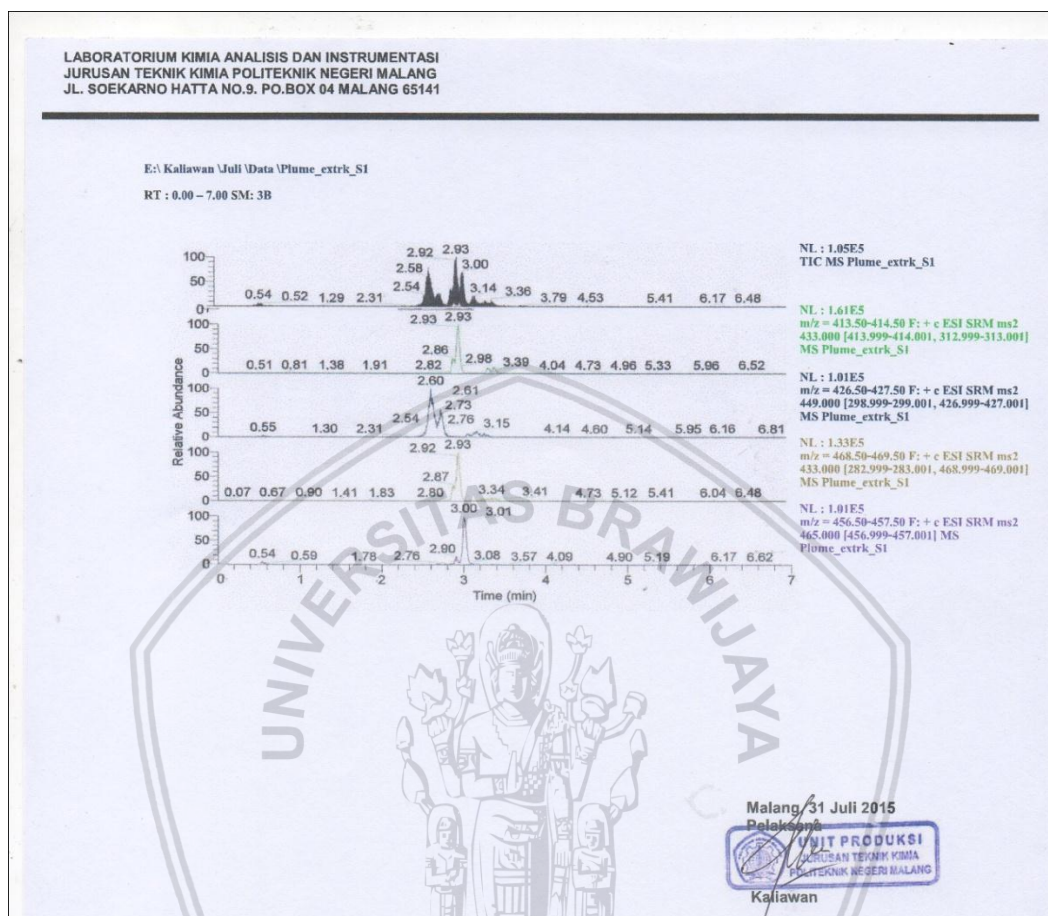
Dependent Variable: COX2

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-44.37500*	2.75150	.000	-52.8714	-35.8786
	3	-32.10000*	2.75150	.000	-40.5964	-23.6036
	4	-13.67500*	2.75150	.001	-22.1714	-5.1786
	5	-3.52500	2.75150	.706	-12.0214	4.9714
2	1	44.37500*	2.75150	.000	35.8786	52.8714
	3	12.27500*	2.75150	.004	3.7786	20.7714
	4	30.70000*	2.75150	.000	22.2036	39.1964
	5	40.85000*	2.75150	.000	32.3536	49.3464
3	1	32.10000*	2.75150	.000	23.6036	40.5964
	2	-12.27500*	2.75150	.004	-20.7714	-3.7786
	4	18.42500*	2.75150	.000	9.9286	26.9214
	5	28.57500*	2.75150	.000	20.0786	37.0714
4	1	13.67500*	2.75150	.001	5.1786	22.1714
	2	-30.70000*	2.75150	.000	-39.1964	-22.2036
	3	-18.42500*	2.75150	.000	-26.9214	-9.9286
	5	10.15000*	2.75150	.016	1.6536	18.6464
5	1	3.52500	2.75150	.706	-4.9714	12.0214
	2	-40.85000*	2.75150	.000	-49.3464	-32.3536
	3	-28.57500*	2.75150	.000	-37.0714	-20.0786
	4	-10.15000*	2.75150	.016	-18.6464	-1.6536

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 13. Hasil Uji LCMS



Pada Uji LCMS telah diketahui bahwa ekstrak metanol daun kmboja putih yang digunakan sebagai terapi terdapat kandungan lupeol asetat didalamnya, yang mana lypeol asetat merupakan turunan dari Terpenoid. Beberapa turunan Terpenoid yang berhasil teridentifikasi berdasarkan berat molekulnya adalah :

- 1) Stigmast-7-enol : Molar mass 414 g/mol
- 2) Ursolic acid: Molar mass 456 g/mol
- 3) lupeol acetat : Molar mass 468 g/mol
- 4) lupeol carboxylic acid : Molar mass 426 g/mol

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan salah satu penyakit inflamasi kronis yang terjadi pada saluran pencernaan (Klein and Eliakim, 2010). Menurut Costas dan Kefalas (2003) *Inflammatory bowel disease* (IBD) terdiri atas dua tipe, yaitu *Chron's Disease* dan *Ulcerative Colitis*. *The Queen Mother Hospital* mencatat bahwa pada 1 Agustus 2003 sampai 31 Desember 2009 kasus IBD pada hewan sering terjadi pada anjing yang mencapai 546 kasus dengan 86 ras yang berbeda (Kathrani *et al.*, 2011). Gejala klinik dari IBD ditandai dengan nyeri abdomen, demam, diare intermiten dan penurunan berat badan. *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) umumnya terjadi karena faktor genetik, flora normal usus, dan faktor lingkungan serta obat NSAID (Klein and Eliakim, 2010).

Menurut Takeuchi *et al.*, (2003) penggunaan obat antiinflamasi nonsteroid (*Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug* (NSAIDs)) seperti indometasin dapat menyebabkan IBD. Dalam kerjanya indometasin menghambat *cyclooxygenase 1* (COX-1) yang berperan dalam pembentukan prostaglandin usus. Hal tersebut menyebabkan penurunan produksi prostaglandin sehingga akan menghambat sekresi mukus di duodenum yang berfungsi sebagai barier mukosa duodenum. Penggunaan indometasin dapat menyebabkan kerusakan jaringan seperti erosi dan ulcer pada mukosa lambung dan usus halus serta perdarahan kolon (Takeuchi, 2012).

Penanganan kasus IBD selama ini dengan menggunakan obat-obatan kimia, seperti kortikosteroid. Namun penggunaan bahan kimia dalam jangka panjang mampu memperparah terjadinya inflamasi. Penggunaan tanaman herbal menjadi salah satu alternatif terapi karena dinilai lebih aman dibandingkan dengan obat-obatan kimia dilihat dari segi toksisitas dan efek samping. Tanaman kamboja putih (*Plumeria acuminata*) merupakan salah satu tanaman untuk alternatif terapi IBD. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Shinde *et al* (2014), tanaman kamboja putih (*Plumeria acuminata*) memiliki efek farmakologi seperti antiinflamatori, antioksidan, antipiretik, dan antimikroba. Kandungan yang terdapat pada daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) berupa *lupeol acetate*, *lupeol carboxylic acid*, *urosilic acid* dan *stigmast-7-enol* (Devprakash, *et al.*, 2011). *Lupeol acetate* yang terkandung dalam daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) merupakan turunan dari triterpenoid yang berfungsi sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Antioksidan memiliki peran penting untuk menghambat dan menangkap radikal bebas.

Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji ekspresi COX-2 dan gambaran histopatologi organ duodenum pada hewan model IBD yang diterapi dengan ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*). Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi indometasin untuk membuat hewan model IBD.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan berikut:

1. Apakah terapi ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dapat mempengaruhi gambaran histopatologi organ duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar model IBD hasil induksi indometasin?
2. Apakah terapi ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dapat mempengaruhi ekspresi COX-2 organ duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar model IBD hasil induksi indometasin?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan coba yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) D'Wistar Bandung, Jawa Barat dengan umur 8-12 minggu. Berat badan tikus antara 150-200 gram. Penggunaan hewan coba ini telah mendapatkan sertifikat dari komisi Etik UB dengan No. 305-KEP-UB.
2. Pembuatan hewan model IBD dilakukan dengan induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB yang diberikan hanya satu kali secara per oral (Aulanni'am, 2012).
3. Daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari tempat pemakaman umum Kelurahan

Penanggunan Kecamatan Lowokwaru Malang dan sudah mendapatkan surat keterangan taksonomi dari Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

4. Ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dibuat dengan metode maserasi.
5. Terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) diberikan dengan dosis 500 mg/kg BB, 750 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB selama 14 hari (Gupta *et al.*, 2006).
6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi COX-2 dengan metode imunohistokimia dan gambaran histopatologi organ duodenum dengan pewarnaan HE.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui pengaruh terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) terhadap gambaran histopatologi organ duodenum hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin.
2. Mengetahui pengaruh terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) terhadap ekspresi COX-2 organ duodenum hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi indometasin.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi mengenai manfaat ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) sebagai alternatif terapi herbal.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model *Inflammatory Bowel*

Disease (IBD)

Hewan Coba yang digunakan untuk penelitian ini adalah Tikus putih (*Rattus norvegicus*) stain Wistar. Hewan percobaan harus memenuhi persyaratan genetik dan memperlihatkan reaksi biologis yang dikehendaki. *Rattus norvegicus* adalah hewan percobaan paling populer dalam penelitian yang berkaitan dengan pencernaan (Hofstetter *et al.*, 2005). Hewan ini dipakai dengan pertimbangan yaitu pola makan omnivora atau pemakan segala makanan, memiliki saluran pencernaan dengan tipe monogastrik. Penggunaan hewan coba ini juga disebabkan karena tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar memiliki jumlah anak yang banyak pada setiap kelahirannya dan reproduksinya menyerupai mamalia besar. Tikus (*Rattus norvegicus*) memiliki beberapa keunggulan, yaitu pemeliharaan dan penanganan mudah, kemampuan reproduksi tinggi dan masa kebuntingan singkat (Bogdanske *et al.*, 2010), serta cocok untuk berbagai penelitian karena beberapa organ tikus lebih mirip manusia dari pada organ mencit. (Hankenson, 2014).

Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* adalah memiliki hidung tumpul, panjang badan 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, telinga relatif kecil. Tikus memiliki masa hidup 2,5-3,5 tahun, denyut jantung 330-480 kali/menit, frekuensi respirasi 85 kali/menit. Berikut klasifikasinya (Armitage, 2004):

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Sub filum	: Vertebrata
Classis	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Sub ordo	: Sciurognathi
Familia	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> strain Wistar

Rattus norvegicus merupakan hewan coba yang sering digunakan dalam penelitian karena berbagai pertimbangan, antara lain omnivora, pemeliharaan dan penanganan yang mudah, potensi reproduksi tinggi, dan memiliki masa bunting yang pendek (Sirois, 2005). Selain itu, tikus mudah diberikan perlakuan secara oral dan tidak muntah karena tikus tidak memiliki kantung empedu. Tikus ini memiliki kebutuhan pakan yaitu 28 gr/hari (Hofstetter *et al.*, 2005). Pakan bisa berupa ikan, daging, biji-bijian dan lain-lain. Sedangkan mencit *Mus Musculus* lebih menyukai biji-bijian. Anjing, kucing, dan tikus *Rattus norvegicus* memiliki kesamaan yakni resisten terhadap pakan yang mengandung kolesterol, serta mudah dicekok dan tidak mengalami muntah karena tikus ini tidak memiliki kantung empedu (Sirois, 2005).



Gambar. 2.1 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) (Bogdanske, *et al*, 2010)

Menurut Corridoni, *et al* (2004) menyatakan bahwa tikus digunakan sebagai hewan model IBD karena mudah diinduksi secara kimia. Penelitian sebelumnya menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang dibuat IBD karena induksi obat-obatan NSAID. Obat yang digunakan adalah indometasin dan diberikan secara per oral. Indometasin di dalam usus halus akan menghambat *Cyclooxygenase* (*non-selective cyclooxygenase inhibitor*) baik *Cyclooxygenase 1* (COX-1) maupun *Cyclooxygenase 2* (COX-2). Penghambatan *Cyclooxygenase* menyebabkan penurunan produksi prostaglandin. Prostaglandin didalam usus halus berperan menstimulasi mukus dan sekresi bikarbonat serta menyebabkan vasodilatasi, suatu aksi yang menjaga mukosa saluran pencernaan. Efek pemberian indometasin menyebabkan sekresi HCL meningkat dan menurunkan sekresi mukus sehingga terjadi IBD (Sparkes, 2010). Pembuatan hewan model IBD menggunakan Indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB. Kondisi IBD dapat terjadi 24 jam pasca induksi indometasin (Aulanni'am *et al.*, 2012).

2.2. Indometasin

Indometasin merupakan salah satu obat antiinflamasi derivat indol-asam asetat dari golongan *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs* (NSAID). Aktivitas farmakodinamik indometasin yaitu bersifat analgesik, antipiretik dan antiinflamasi (Matsui *et al.*, 2011; Laudanno *et al.*, 2006). Indometasin diabsorpsi baik secara per oral, 92-99% indometasin terikat dengan plasma darah. Indometasin adalah salah satu obat NSAID yang efektif, tetapi memiliki resiko yang lebih tinggi dengan efek samping berupa ulserasi, pendarahan lambung, diare, sakit kepala dan pusing. Indometasin juga dapat menyebabkan *dyscrasias* pada darah. (Wilmana, 2007).

Indometasin bekerja dengan menghambat enzim *cyclooxygenase* yang mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin. Enzim *Cyclooxygenase* terdiri atas *Cyclooxygenase-1* (COX-1) dan *Cyclooxygenase-2* (COX-2). COX-1 berperan dalam menjaga permukaan lambung dan usus tetap baik dengan mencegah pembentukan asam lambung, meningkatkan sekresi mukus dan asam bikarbonat. COX-2 berperan dalam pembentukan prostaglandin ketika terjadi inflamasi akut. Indometasin bekerja menghambat COX-1 dan COX-2 tetapi lebih spesifik menghambat COX-1. Penghambatan COX-1 dapat meningkatkan ekspresi dari COX-2, tetapi karena indometasin dapat menghambat COX-2 maka produksi prostaglandin menurun. Penurunan produksi prostaglandin disebabkan penghambatan kerja enzim *cyclooxygenase* dalam merubah asam arakidonat menjadi prostaglandin. Mekanisme penghambatan COX-1 menyebabkan terjadinya iritasi usus

berupa lesi pada mukosa yang menimbulkan perdarahan usus (Taukechi, 2012).

Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAID) menyebabkan hipermotilitas pada saluran pencernaan khususnya duodenum, diikuti dengan kerusakan kapiler dan aktivasi neutrofil yang memicu terjadinya kerusakan duodenum. Hipermotilitas duodenum dan rusaknya pembuluh darah berkaitan dengan penurunan prostaglandin akibat hambatan dari COX-1. Penghambatan pada COX-1 dapat meningkatkan ekspresi COX-2, sehingga dihasilkan PGE2 yang dapat menekan interaksi neutrofil dengan endotel, oleh karena itu, indometasin dapat meredakan gejala peradangan seperti nyeri, tetapi dapat menyebabkan kerusakan duodenum (Takeuchi, 2012).

2.3. Inflammatory Bowel Disease (IBD)

2.3.1. Etiologi

IBD merupakan penyakit inflamasi kronis yang menyerang saluran pencernaan mulai dari mulut hingga kolon. Terjadinya IBD bisa disebabkan oleh bakteri, seperti *Helicobacter pylori* dan enterohepatic *Helicobacter* (EHH) yang mana bakteri tersebut melakukan kolonisasi diusus halus dan hepar, sehingga mampu menyebabkan terjadinya IBD. *Helicobacter pylori* biasanya menempel pada permukaan epitel lambung dan juga ditemukan pada kolon, sehingga keberadaan bakteri tersebut juga mampu menyebabkan terjadinya IBD (Kenaan *et al.*, 2010). Adanya pakan yang kurang bersih yang diberikan pada hewan dapat memicu terjadinya IBD.

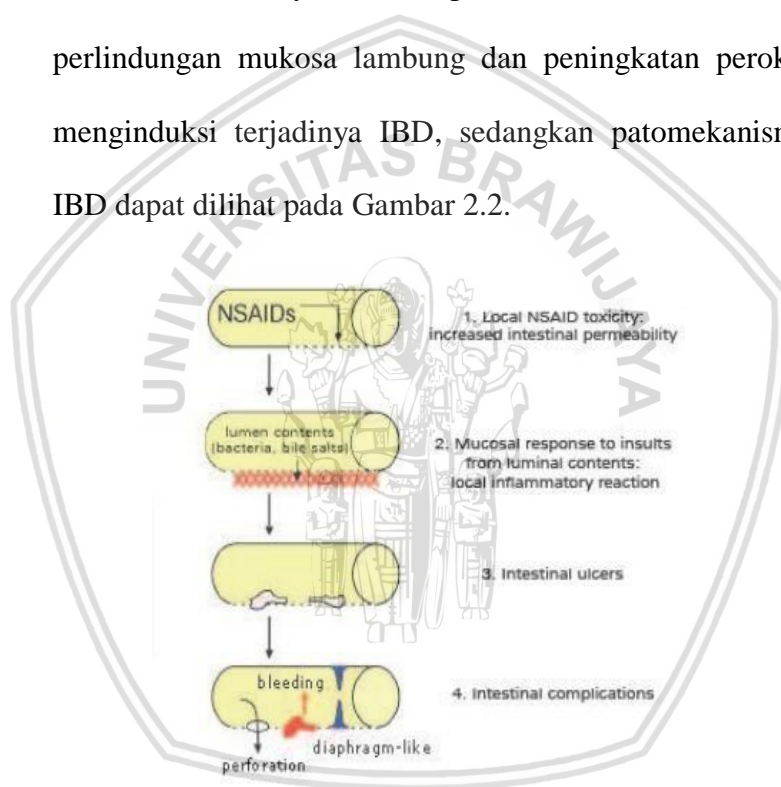
Kelainan genetik dan gangguan regulasi imunologi juga dapat menyebabkan terjadinya IBD (Gradel *et al.*, 2009). Selain itu, *Non-Steroidal Antiinflammatory Drug* (NSAID) seperti indometsin, aspirin, ketoprofen, dan ibuprofen dapat menyebabkan penurunan mukosa saluran pencernaan sehingga dapat menyebabkan IBD (Tanaka *et al.*, 2006).

2.3.2. Patomekanisme

Jalur akhir umum daripada patofisiologi IBD adalah inflamasi pada mukosa traktus intestinal menyebabkan ulserasi, edema, perdarahan, kemudian hilangnya air dan elektrolit yang diikuti terjadinya hipoksia. Kondisi tersebut dapat menyebabkan kebocoran mitokondria dan keluarnya elektron-elektron dari mitokondria yang mana akan ditangkap oleh Cu^{2+} dan Fe^{2+} . Elektron-elektron yang berikatan dengan Cu^{2+} dan Fe^{2+} akan menghasilkan ion O_2^- dan H_2O_2 . Ion O_2^- dan H_2O_2 berkonjugasi dan menghasilkan radikal hidroksil (OH^*) yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan struktur protein dan peroksidasi lipid (Konturek *et al.*, 2003).

Banyak mediator inflamasi yang telah diidentifikasi pada IBD, dimana mediator-mediator ini memiliki peranan penting pada patologi dan karakteristik klinik penyakit ini. Sitokin yang dikeluarkan oleh makrofag karena respon daripada berbagai rangsangan antigenik, berikatan dengan reseptor-reseptor yang berbeda, kemudian menghasilkan efek-efek autokrin, parakrin, dan endokrin. Sitokin juga

akan mendiferensiasikan limfosit menjadi berbagai tipe sel T. Sel T helper tipe 1 (TH-1) berhubungan dengan *Crohn Disease*, sedangkan TH-2 berhubungan dengan *Ulcerative Colitis*. Respon imun inilah yang akan merusak mukosa intestinal dan menyebabkan proses inflamasi yang kronis (Danastri dan Ida, 2011). Adanya radikal bebas berlebih dalam sel menyebabkan penurunan antioksidan, penurunan perlindungan mukosa lambung dan peningkatan peroksidasi dapat menginduksi terjadinya IBD, sedangkan patomekanisme teradinya IBD dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Patomekanisme IBD (Paiotti, 2014).

2.4. Duodenum

Intestinum umumnya memiliki dua fungsi utama yaitu pencernaan dan penyerapan. Makanan yang masuk melalui mulut kemudian dilanjutkan oleh organ traktus digestivus. Proses pencernaan makanan di duodenum seperti pencernaan karbohidrat, lemak dan protein menjadi zat yang lebih sederhana

oleh bantuan enzim pankreas. Proses pencernaan lemak membutuhkan garam empedu untuk mengemulsi lemak agar dapat di absorpsi. Pada epitel usus halus juga terdapat enzim yang digunakan untuk memecah disakarida maupun polimer glukosa kecil menjadi monosakarida yaitu laktosa, sukrosa dan maltosa (Eroschenko, 2003). Absorpsi gula, asam amino dan lemak sebagian besar terjadi di duodenum dan jejunum (Guyton, 2007).

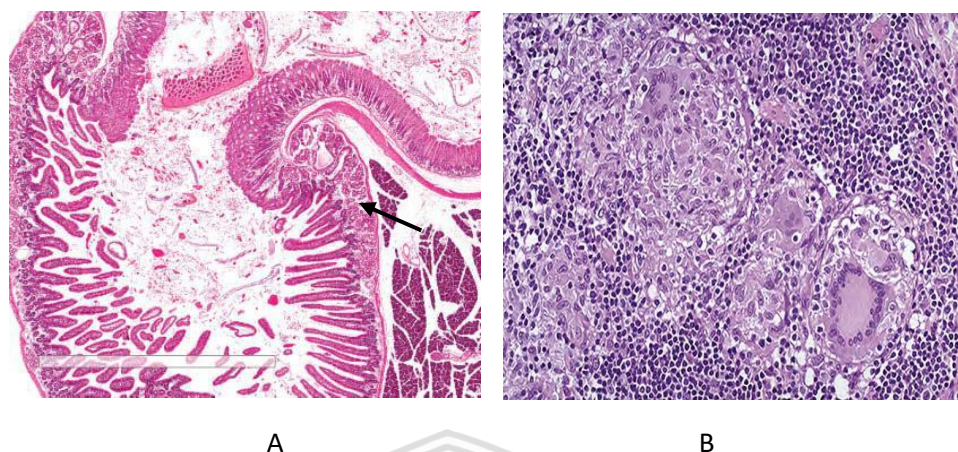
Efisiensi fungsi absorpsi duodenum dipengaruhi oleh struktur mukosa duodenum yang disebut plika sirkularis. Plika sirkularis mampu meningkatkan daerah permukaan absorpsi mukosa menjadi tiga kali lipat. Duodenum memiliki kelenjar duodenum (brunner) yang terletak di submukosa duodenum. Kelenjar brunner menghasilkan mukus yang bersifat alkalis untuk melindungi dinding duodenum dari asam lambung yang bersifat sangat asam. Kelenjar ini menghasilkan hormon sekretin yang mampu menghambat sekresi HCL lambung dan akan meningkatkan proliferasi epitel dalam usus halus (Eroschenko, 2003).

Gambaran patologi gastrointestinal yang terkena rangsangan berupa jejas umumnya menimbulkan erosi mukosa dan ulserasi mukosa. Erosi mukosa merupakan keadaan kehilangan sebagian dari ketebalan mukosa, sedangkan ulserasi mukosa merupakan keadaan hilangnya seluruh tebal mukosa (Eroschenko, 2003). Adanya rangsangan baik endogen maupun eksogen yang menimbulkan jejas sel akan menyebabkan reaksi radang. Radang pada duodenum menyebabkan terjadinya kerusakan pada permukaan mukosa duodenum. Ketika duodenum mengalami jejas, kelenjar brunner akan

memproduksi faktor penumbuh epidermal (EGF) yang tahan terhadap tripsin, kemotripsin dan pepsin. EGF bekerja dengan memodulasi sekresi asam lambung dan mempengaruhi kecepatan proliferasi dalam kriptus usus (Fawcett and William, 2002).

Manifestasi klinik radang pada gambaran histologi duodenum ditemui gambaran sel radang sampai pada mukosa lamina propria, deskuamasi epitel, erosi dan ulserasi pada mukosa duodenum (Fawcett and William, 2002). Salah satu penyebab kerusakan pada duodenum yaitu pemakaian obat golongan NSAIDs (*Non-Steroid Anti Inflammatory Drugs*) secara kronik dan reguler. Obat golongan NSAIDs bersifat asam sehingga menyebabkan kerusakan epitel pada gastroduodenal (Furst and Ulrich, 2007).

Gambaran histopatologi duodenum IBD dapat ditemukan kelainan berupa epitel permukaan yang masih utuh, walaupun epitel permukaan terlepas namun terbatas pada lapisan permukaan mukosa, pada IBD erosif terdapat hemoragik akut dimana perdarahannya segar, nekrosis bersifat fokal pada permukaan dan daerah mukosa. Sel radang ditemukan pada daerah lumen kelenjar disertai dengan penumpukan sel limfosit (Klatt, 2015), namun peradangan tidak terjadi secara menyeluruh. Bila erosi meluas lebih dalam dapat berkembang menjadi ulkus (Junquiera *et al.*, 2004) dapat dilihat pada Gambar 2.3 (B).



Gambar 2.3. Histologi normal duodenum

Keterangan: (A) yang menunjukkan letak kelenjar brunner (anak panah hitam) dan histopatologi IBD (B) yang menunjukkan inflamasi berbentuk granuloma dan penumpukan dari sel limfosit pada sel epitel (Rishi, 2017).

2.5. *Cyclooxygenase-2* (COX 2)

Enzim *cyclooxygenase* terdapat dalam 2 isoform disebut COX-1 dan COX-2. Kedua isoform tersebut telah dikode oleh gen yang berbeda dan ekspresinya bersifat unik. Secara garis besar COX-1 esensial dalam pemeliharaan berbagai fungsi dalam kondisi normal di berbagai jaringan khususnya ginjal, saluran cerna, dan trombosit. Di mukosa duodenum, aktivasi COX-1 menghasilkan prostasiklin yang bersifat sitoprotektif. *cyclooxygenase-2* semula diinduksi berbagi stimulus inflamatoar, termasuk sitokin, endotoksin.

Cyclooxygenase-2 merupakan enzim yang tersusun dari 604 asam amino. Enzim ini berfungsi merubah asam arakidonat menjadi berbagai macam protaglandin. Berbeda dengan isoformnya, COX-1 yang terekspresi di berbagai organ secara fisiologis karena berguna untuk mempertahankan kondisi dan fungsi berbagai organ, COX-2 terekspresi pada organ-organ dengan stimulus

dan induksi seperti sitokin dan faktor pertumbuhan yang umumnya terjadi saat inflamasi (Cheng, 2013).

Dalam proses inflamasi, PGE2 yang merupakan hasil konversi asam arakidonat oleh COX-2 berperan penting dalam mutasi gen dan proliferasi sel. PGE2 menstimulasi pertumbuhan pembuluh darah, menghambat fungsi imun, dan meregulasi sinyal transduksi sel yang sangat berpengaruh pada pertumbuhan sel tumor. (Li, *et al*, 2013). Ekspresi COX-2 yang berperan penting dalam proses inflamasi, berhubungan pula dengan mutasi dan gen-gen supresor. Overekspresi COX-2 sendiri terbukti berkorelasi dengan peningkatan biosintesis PGE2 dan angiogenesis. COX-2 juga dapat meningkatkan ekspresi Bcl-2 yang menyebabkan penghambatan apoptosis dari sel endotelial dan menginduksi formasi pembuluh darah baru, sehingga dengan dihamatnya pembentukan COX-2 diharapkan mampu menjadi pencegah progresifitas keganasan pada kasus inflamasi duodenum (Cheng, 2013).

2.6. Kamboja Putih

Kamboja putih (*Plumeria acuminata*) merupakan tanaman yang berasal dari Meksiko, Amerika Tengah dan Amerika selatan. Tanaman ini tersebar di seluruh daerah tropis, salah satunya di Indonesia. Kamboja banyak digunakan sebagai obat demam, diare, gatal dan nyeri. Secara morfologi pohon kamboja memiliki ketinggian 3-7 meter, batangnya bengkok dan mengandung getah rantingnya besar, daun berbentuk lonjong dengan panjang 4 cm dan lebar 7 cm. Mahkota berbentuk corong, sisi dalam berambut, sisi luar putih sisi dalam

kekuningan, berbau harum. Tangkai putik pendek, tumpul, lebar, bakal buah 1 atau 2, berbentuk tabung gepeng memanjang 18-20 cm, lebar 1-2 cm, berbiji banyak, biji bersayap, ketika masih muda hijau setelah tua hitam kecoklatan (Shinde, 2014). Morfologi tanaman kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.) dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.) (Shinde, 2014).

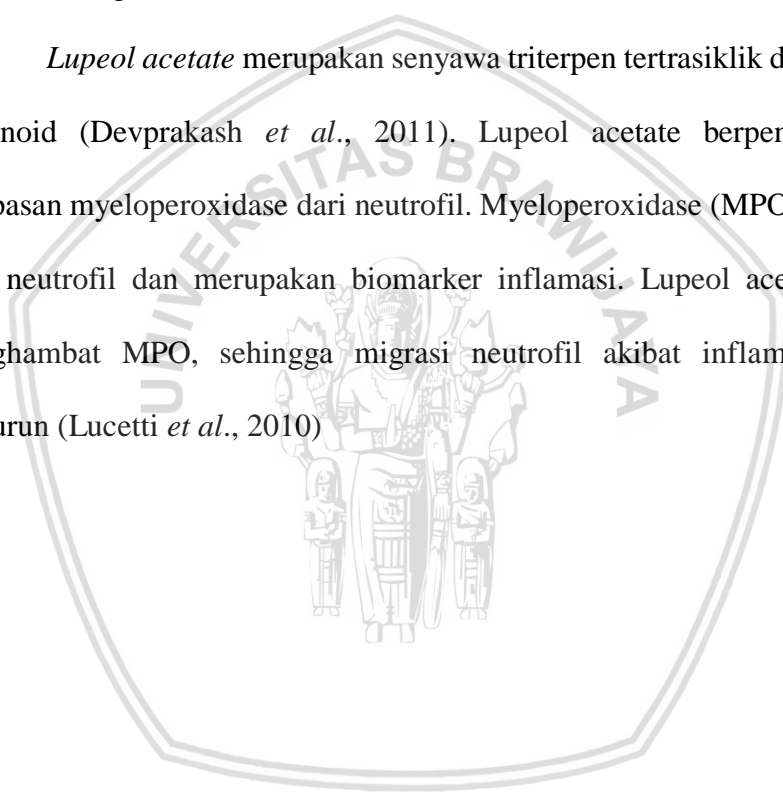
Taksonomi dari kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dapat dijelaskan sebagai berikut:

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Magnoliophyta
- Kelas : Magnoliopsida
- Ordo : Gentianales
- Family : Apocynaceae
- Genus : *Plumeria*
- Spesies : *Plumeria acuminata*

Kandungan yang terdapat pada akar yaitu fulvoplummierin, plumericin, isoplumericin, β -dihydroplumericin dan asam β dihydroplumericinic.

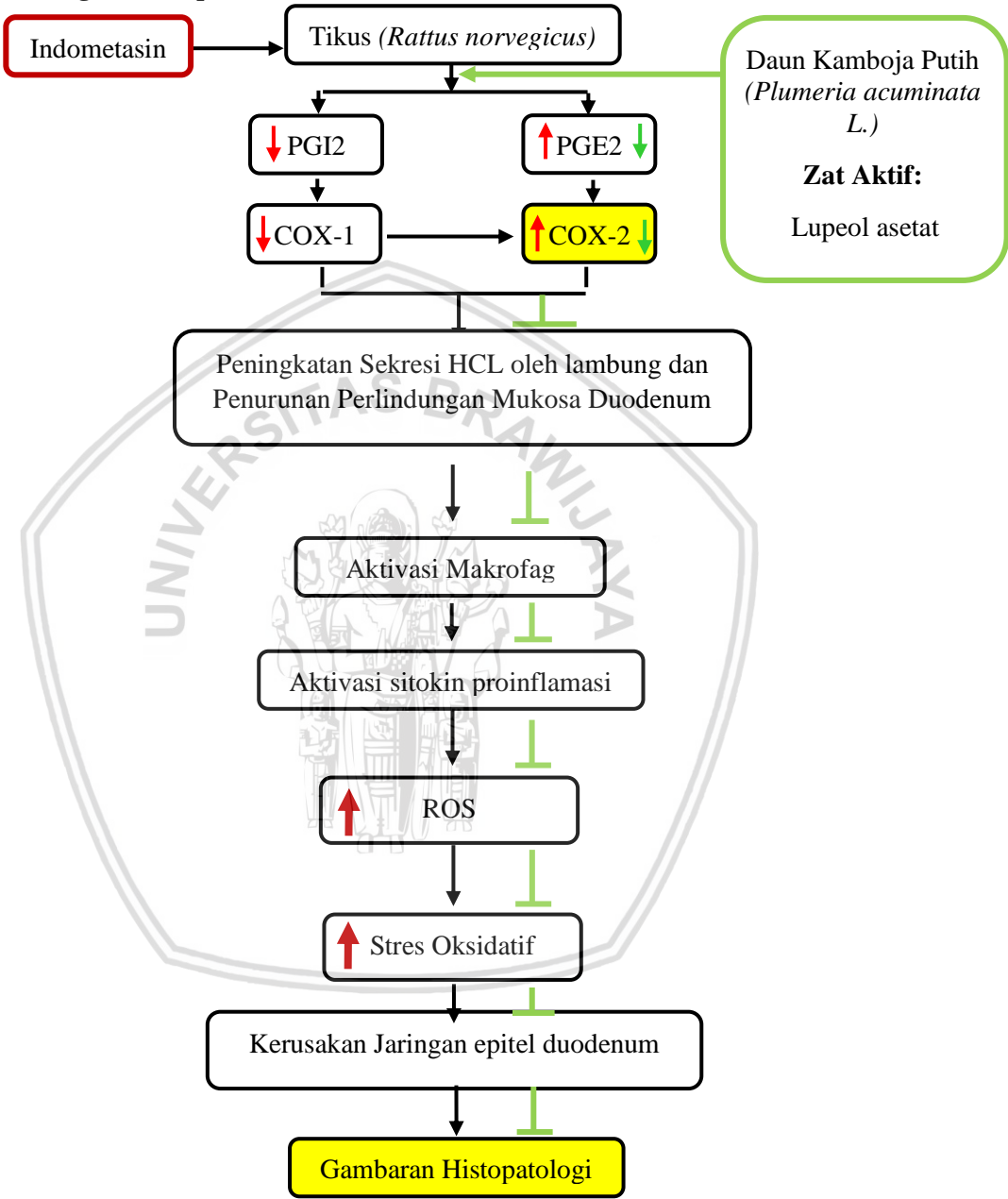
Kandungan lain yang terdapat pada batang *Plumera acuminata L.* yaitu minyak esensial yang terdiri atas alkohol, geraniol, citronellol, famesol dan fenylethyl alkohol dengan sedikit jumlah aseton (6,8 %). Sedangkan, kandungan yang terdapat pada daun yaitu stigmast-7-enol, asam lupeol karbosilik, lupeol asetat dan ursolik. Zat lupeol asetat yang terkandung pada daun diketahui memiliki aktifitas sebagai antiinflamasi dan antioksidan (Pand, 2006).

Lupeol acetate merupakan senyawa triterpen tertrasiklik dari golongan terpenoid (Devprakash *et al.*, 2011). Lupeol acetate berpengaruh pada pelepasan myeloperoxidase dari neutrofil. Myeloperoxidase (MPO) dilepaskan oleh neutrofil dan merupakan biomarker inflamasi. Lupeol acetate bekerja menghambat MPO, sehingga migrasi neutrofil akibat inflamasi menjadi menurun (Lucetti *et al.*, 2010)



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep



Keterangan gambar:

- : Induksi Indometasin
- : Mekanisme di dalam tubuh tikus
- : Parameter yang dimati
- : Terapi ekstrak daun kamboja
- ↓ : Jalur di dalam tubuh tikus
- ↑ : Pengaruh induksi Indometasin
- ↓ : Pengaruh Daun Kamboja Putih
- ┐ : Menghambat

Inflammatory Bowel Disease (IBD) merupakan penyakit inflamasi pada saluran gastrointestinal yang ditandai dengan peradangan dan infiltrasi seluler pada mukosa lambung, usus halus dan usus besar yang diawali dengan masuknya agen kausatif ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan. Agen kausatif yang digunakan berupa indometasin. Indometasin merupakan salah satu obat golongan NSAID penyebab IBD karena mekanisme kerja indometasin dapat menghambat *cyclooxygenase-1* (COX-1) dan *cyclooxygenase-2* (COX-2). Secara normal enzim COX-1 dan COX-2 terdapat dalam jumlah kecil pada jaringan. COX-1 berfungsi memberikan efek perlindungan terhadap mukosa duodenum. Sedangkan COX-2 muncul karena adanya suatu inflamasi.

COX-1 dan COX-2 diinduksi oleh sitokin dan adanya stress pada jaringan. Salah satu efek penggunaan obat NSID yaitu dapat menyebabkan terjadinya peningkatan sekresi HCL pada lambung, penurunan aliran darah mukosa usus dan penurunan sekresi mucus. Hal ini dapat memicu aktifitas makrofag dalam memfagositosis sel debris dari sel nekrosis dan menginduksi keluarnya sitokin proinflamasi yang kemudian merangsang mediator inflamasi dan peningkatan produksi *Reactive Oxide Species* (ROS). Peningkatan ROS akan menimbulkan stress oksidatif, selanjutnya stress oksidatif akan menyebabkan terganggunya fungsi sel sehingga terjadi kerusakan jaringan pada duodenum.

Kandungan lupeol asetat yang ada pada daun kamboja putih merupakan senyawa turunan dari triterpenoid yang dapat digunakan sebagai

antiinflamatori dan antioksidan. Antioksidan mempunyai peran penting untuk menstabilkan radikal bebas dengan menghambat proses peroksidasi lipid dan menghentikan stress oksidatif sehingga peningkatan COX-2 dapat ditekan. Kemampuan lupeol asetat dalam menghambat sitokin proinflamasi juga dapat menyebabkan berkurangnya keparahan inflamasi sehingga kerusakan sel-sel pada duodenum dapat berkurang kemudian dapat memperbaiki gambaran histologi pada jaringan duodenum

3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis penelitian ini adalah :

1. Terapi Ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminta L.*) dapat memperbaiki gambaran histopatologi duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD yang telah di induksi dengan indometasin.
2. Terapi Ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminta L.*) dapat menurunkan kadar COX-2 pada jaringan duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD yang telah di induksi dengan indometasin.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Juni 2015. Pembuatan Tikus model IBD dan pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dilaksanakan di Laboratorium Sentra Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya. Pengoleksian sampel dilakukan di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Pembuatan preparat Immunohistokimia dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Pembuatan preparat untuk Histopatologi duodenum dilakukan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang berumur 8-12 minggu dengan berat badan antara 150-200 gram. Aklimatisasi dilakukan selama tujuh hari agar tikus beradaptasi dengan kondisi laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$t(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 macam kelompok perlakuan diperlukan ulangan minimal 4 kali dalam setiap kelompok sehingga total hewan coba yang diperlukan sebanyak 20 ekor.

4.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan sederhana dimana hewan coba dibagi menjadi 5 kelompok secara acak (Tabel 4.1). Setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus mendapat perlakuan berbeda-beda. Kelompok A adalah tikus yang tidak diberi perlakuan sebagai kontrol negatif. Kelompok B adalah tikus yang diberi indometasin sebagai kontrol positif. Kelompok C adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dengan dosis 500 mg/kg BB. Kelompok D adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dengan dosis 750 mg/kg BB. Kelompok E adalah tikus yang diinduksi indometasin kemudian diterapi menggunakan ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) dengan dosis 1000 mg/kg BB.

Tabel 4.1. Rancangan kelompok penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan			
ktivitas COX-2 dan Histopatologi Duodenum	1	2	3	4
Kelompok A (kontrol negatif)				
Kelompok B (kontrol positif)				
Kelompok C (terapi 500mg/kg BB)				
Kelompok D (terapi 750mg/kg BB)				
Kelompok E (terapi 1000mg/kg BB)				

4.4. Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

- Variabel Bebas : Induksi indometasin dan dosis ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*)
- Variabel tergantung : Aktivitas COX-2 dan Histopatologi duodenum
- Variabel kendali : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan Strain Wistar, berumur 8-12 minggu, berat badan 150-200 gram, pakan, minum, suhu dan kelembaban kandang.

4.5. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang tikus, spuit 5 mL, spuit 1 mL, gunting, objek glass, scalpel, mortar, microtube, water bath 100°C, alat bedah, vortex, kertas saring, micropipet, tabung reaksi 250 mL, tabung reaksi 10 mL, cawan petri, tabung erlenmeyer, corong kaca, tabung

ependorf, cup plastik, *cover glass*, *micropipet*, *Freezer*, oven, dan mikroskop olympus BX-51.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), indometasin, minyak jagung, larutan, fosfat buffer saline (PBS), paraformaldehidat (PFA), aquades, antibodi anti-rat COX-2, DAB (diaminobenzidin), Dako LSAB (*labeled streptavidin biotin*) system-HRP (berisi *anti rabbit IgG biotin labeled* dan Strepto-avidin peroksidase) (LOT 100478443), pewarna histologi Hematoksin Eosin (HE), NaCl fisiologis 0,9%, alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 90%, alkohol 95%, parafin, xylol, chloroform, alkohol absolut, metanol, daun kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.), entelan, dan eter 70%.

4.6. Tahapan Penelitian

Tahapan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut:

- Persiapan Hewan Coba
- Persiapan Hewan Model IBD dengan Induksi Indometasin
- Penentuan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*)
- Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*)
- Pengambilan Organ Duodenum
- Pembuatan Preparat Histopatologi
- Pewarnaan dengan Hematoksin Eosin
- Pengamatan Preparat Histopatologi Duodenum
- Pengamatan Ekspresi COX-2 dengan Metode Imunohistokimia

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Persiapan Hewan Coba

Tikus yang digunakan untuk penelitian di aklimatisasi selama tujuh hari, sehingga dapat beradaptasi dengan lingkungan laboratorium. Tikus di beri pakan ransum basal yang disusun berdasarkan *Association of Analytical Communities* (AOAC) (2005) yaitu mengandung karbohidrat, protein, lemak, vitamin dan air. Rata-rata konsumsi pakan tikus perhari (5g/100gBB/hari) dan diberikan air minum *adlibitum*. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

Kandang tikus berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm, dengan jumlah tikus sesuai dengan kebutuhan. Kandang terbuat dari bahan plastik. Suhu optimum untuk kandang tikus adalah 22-24 °C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup. Kandang tikus harus berlokasi di tempat yang tenang, sehingga tikus tidak stres.

4.7.2. Persiapan Hewan Model IBD dengan Induksi Indometasin

Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) di induksi indometasin secara per oral dengan dosis 15mg/kg BB tikus (Aulani'am, 2012). Adapun sebelum Indometasin diberikan pada tikus, harus dilakukan pengenceran dengan minyak jagung terlebih dahulu. Tikus yang digunakan memiliki berat badan rata-rata sekitar 160 gram. Dosis indometasin yang diberikan pada setiap tikus adalah 2,4 mg/tikus. Pengenceran indometasin sebanyak 45 mg dibutuhkan 4 mL minyak jagung sebagai pelarutnya (Bures *et al.*,

2011). Perhitungan dosis indometasin dan minyak jagung yang diberikan secara per oral adalah sebagai berikut:

Kebutuhan indometasin

$$15 \text{ mg/kg BB} \times 0,16 \text{ kg} = 2,4 \text{ mg/tikus}$$

Kebutuhan minyak jagung

$$\underline{2,4 \text{ mg}} \times 4 \text{ mL} = 0,213 \text{ mL/tikus}$$

45 mg

Campuran indometasin dengan minyak jagung di homogenkan menggunakan alat getar vorteks. Pemberian indometasin pada tikus dilakukan menggunakan sonde. Kemudian di inkubasi selama 24 jam. Hasil induksi indometasin dapat mengakibatkan kerusakan sel-sel pada daerah mukosa lambung dan usus.

4.7.3. Penentuan Dosis dan Pembuatan Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*)

Penentuan dosis ekstrak daun kamboja (*Plumeria acuminata* L.) didasarkan pada penelitian Gupta (2006), yaitu 500 mg/kg BB – 2000 mg/kg BB yang merupakan dosis terapi anti inflamasi dan memiliki kemampuan hepatoprotektif. Penggunaan dosis diatas 2000 mg/kg BB diduga memiliki efek toksik. Oleh karena itu pada penelitian dosis yang digunakan adalah 500 mg/kg BB, 750 mg/kg BB dan dosis 1000 mg/kg BB sebagai dosis untuk terapi IBD.

Metode pembuatan ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.) didasarkan atas metode yang digunakan Gupta (2006), daun kamboja putih

(*Plumeria acuminata* L.) yang sudah kering dibuat bubuk dengan menggunakan penyaring No.40. Bubuk daun kamboja (*Plumeria acuminata* L.) kemudian ditimbang sesuai dosis 500 mg/kg BB (Kelompok C), 750 mg/kg BB (kelompok D) dan 1000 mg/kg BB (kelompok E). Selanjutnya bubuk daun kamboja di ekstrak menggunakan eter 60-80 °C selama 18 jam. Hasil ekstraksi tersebut kemudian di ekstrak kembali menggunakan metanol hingga terbentuk massa semisolid. Setelah itu dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring hingga didapatkan ekstrak daun kamboja dosis 500 mg/kgBB, 750 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB yang dipersiapkan setiap hari.

4.7.4. Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata*)

Terapi ekstrak daun kamboja diberikan pada tikus kelompok C, D dan E. Metode pemberian volume terapi per oral tiap ekor tikus berdasarkan metode yang diterapkan Bekow and Baumans (2003) sebanyak 2 mL pada kelompok tikus (C) terapi ekstrak metanol *Plumeria acuminata* dosis 500 mg/kg BB, (D) ekstrak methanol *Plumeria acuminata* dosis 750 mg/kg BB dan (E) ekstrak metanol *Plumeria auminata* dengan dosis 1000 mg/kg BB yang diberikan 24 jam setelah induksi indometasin. Pemberian terapi ekstrak methanol *Plumeria acuminata* dilakukan selama 2 minggu berturut-turut (Rajendran, 2010).

4.7.5. Pengambilan Organ Duodenum

Pengambilan organ duodenum pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-16 setelah seluruh perlakuan dilakukan. Prosedur pertama yang dilakukan untuk pengambilan organ duodenum adalah hewan coba di dislokasi pada bagian leher kemudian dilakukan pembedahan. Tikus diletakkan secara ventrodorsal dan pembedahan dilakukan pada bagian perut. Kemudian diambil organ duodenumnya, diisolasi dan dipotong pada bagian tengah. Organ duodenum mula-mula dibilas dengan NaCl-fisiologis 0,9%, kemudian organ duodenum dimasukkan dalam larutan *Phospate Buffer Saline*-azida (PBS-azida) pH 7,4 dan sebagian lagi dimasukkan pada larutan formaldehyde (PFA) 10%.

4.7.6. Pembuatan Preparat Histopatologi

Sampel duodenum yang diperoleh, dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9% bertujuan untuk menghilangkan darah. Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, penjernihan, infiltrasi parafin, embedding, sectioning, penempelan digelas objek serta pewarnaan.

Fiksasi untuk inaktivasi enzim degradasi dan mencegah kerusakan jaringan serta menjaga kontinuitas jaringan. Tahapan fiksasi yaitu dengan memasukkan jaringan ke dalam larutan PFA 4%, kemudian direndam dalam etanol 70% selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan proses dehidrasi. Proses dehidrasi diawali dengan merendam jaringan dalam larutan etanol dengan konsentrasi bertingkat mulai dari 70% selama 24 jam, kemudian didalam etanol 80% selama 2 jam, dilanjutkan etanol 90%, sampai absolut

masing-masing membutuhkan waktu 20 menit. Proses dehidrasi berfungsi untuk menghilangkan sisa air yang ada di dalam jaringan.

Tahapan selanjutnya yaitu penjernihan, dengan cara jaringan dipindahkan dari alkohol absolut ke dalam larutan penjernihan yaitu xylol I (20 menit), xylol II (30 menit). Tahap penjernihan berfungsi untuk menghilangkan sisa etanol. Kemudian dilanjutkan dengan proses infiltrasi dilakukan dalam parafin cair yang ditempatkan dalam inkubator bersuhu 58-60 °C dan membiarkan parafin memasuki sela-sela jaringan.

Proses embedding dilakukan dengan mencelupkan jaringan dalam parafin cair yang telah dituang ke dalam cetakan. Setelah beberapa saat parafin akan memadat. Pembuatan preparat dilakukan dengan memasukkan hasil embedding pada penjepit (block holder). Sectioning diawali dengan mengatur ketebalan irisan dengan ukuran $\pm 4-5 \mu\text{m}$ dengan menggunakan mikrotom. Hasil irisan dipindahkan dengan kuas ke dalam air hangat 38-40°C untuk membuka lipatan dan meluruskan kerutan halus yang ada. Irisan yang terentang sempurna diambil dengan gelas objek. Potongan terpilih dikeringkan dan diletakkan di atas hot plate 38-40°C sampai kering. Selanjutnya preparat disimpan dalam inkubator pada suhu 38-40°C lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Junquiera dan Carneiro, 2007).

4.7.7. Prosedur Pewarnaan dengan *Hematoksilin Eosin* (HE)

Sediaan dideparafinisasi dengan *xylol* sebanyak 2 kali, masing-masing selama 5 menit. Kemudian dilakukan dehidrasi untuk dengan etanol bertingkat (95%, 90%, 80%, 70%) selama 5 menit. Kemudian dilanjutkan

dengan pencucian menggunakan akuades selama 5 menit. Langkah selanjutnya sediaan diwarnai dengan *Hematoxyline* selama 10 menit dan lalu dilanjutkan di bilas dengan air mengalir selama 30 menit lalu bilas dengan aquades selama 5 menit untuk menghilangkan sisa pewarnaan dan dineri pewarnaan eosin selama 5 menit. Kemudian direndam dengan akuades untuk menghilangkan kelebihan eosin. Prosedur berikutnya adalah dilakukan rehidrasi menggunakan etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) selama masing-masing 3 selama 5 menit. Sediaan yang sudah kering di *mounting* dengan *entelan* dan ditutup dengan *cover glass*. dilanjutkan pengamatan dengan mikroskop olympus dengan perbesaran 100 kali dan 400 kali (Bancroft, 2008).

4.7.8. Pengamatan Preparat Histopatologi Duodenum

Hasil pembuatan preparat histopatologi duodenum melalui pewarnaan hematoksin-eosin (HE) diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya Olympus BX51 dengan perbesaran 100x, kemudian perbesaran 400x untuk melihat adanya perubahan struktur komponen pada jaringan terutama pada bagian vili duodenum. Bagian vili yang diamati difokuskan pada sel epitel pada ujung vili. Hal ini dilakukan karena ujung vili merupakan tempat pertama yang terpapar oleh indometasin dimana kerusakan jaringan akan terlihat. Selain pengamatan terhadap struktur sel epitel, dilakukan juga pengamatan terhadap munculnya sel-sel inflamasi pada daerah vili duodenum.

4.7.9. Prosedur Pewarnaan dengan Metode Imunohistokimia

Pada pengamatan ekspresi COX-2 dengan imunohistokimia dipakai antibodi monoklonal anti COX-2 untuk mengidentifikasi ekspresi COX-2. Sediaan direndam dengan xylol sebanyak 2 kali selama 5 menit, dimasukan ke dalam etanol bertingkat (70%, 80%, 90%, 95%) selama 5 menit dan dicuci PBS PH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali. Kemudian ditetesi dengan Hidrogen Peroksida selama 20 menit dan dicuci PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali.. Kemudian ditetesi BSA 1 % dalam PBS selama 30 menit dalam suhu ruang lalu dicuci selama 5 menit sebanyak 3 kali. Selanjutnya diinkubasi dengan antibodi primer *anti Rat COX-2* selama 1 hari (24 jam) pada suhu 4°C kemudian dicuci dengan PBS selama 5 menit sebanyak 3 kali dan ditetesi dengan antibodi sekunder (*Goat anti rat Ig G biotin labeled*) dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 60 menit.

Proses selanjutnya sediaan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali, lalu ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin-Horseradish peroksidase*) lalu diinkubasi selama 30-60 menit. Proses berikutnya sediaan dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak 3 kali dan diberi DAB (*diaminobenzidin*) selama 10 menit, kemudian sediaan dicuci dengan aquades selama 5 menit sebanyak 3 kali dan dilakukan *counterstain* dengan *Mayer's hematoxylyn* selama 5 menit. Selanjutnya dicuci dengan aquades lalu dikeringkan dan dilakukan *mounting* dengan menggunakan entellen sebagai pengawet dan memberikan warna cerah. Proses selanjutnya sediaan diamati pada daerah vili yang ditanda dengan

munculnya ekspresi COX-2 pada sitoplasma sel epitel duodenum dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 400 kali. (Dabbs, 2014).

4.7.10. Pengamatan dan Perhitungan Area Ekspresi COX-2

Hasil preparat duodenum yang telah melalui pewarnaan immunohistokimia, kemudian difoto menggunakan mikroskop olympus dengan perbesaran 400 kali, kemudian dianalisis secara kuantitatif yang dilakukan menggunakan program *software immunoratio* dengan menghitung persentase area ekspresi COX-2 dengan pengamatan lima lapang pandang. Program *software immunoratio* bisa diakses secara bebas di web <http://153.1.200.58:8080/immunoratio/>. Ekspresi *cyclooxygenase* dianalisis melalui warna coklat oleh DAB yang terlihat saat dilakukan identifikasi preparat immunohistokimia. Warna coklat yang dipilih berdasarkan dengan ukuran yang tertera pada *software immunoratio* yang disesuaikan dengan ukuran sel yang ingin dilihat (Mungle dkk, 2016). Hasil persentase (%) didapatkan dari perbandingan warna coklat oleh DAB yang terpilih dengan total luas area seluruh lapang pandang (Tuominen dkk, 2010)

4.8. Analisa Data

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah ekspresi COX-dan histopatologi duodenum. Data yang diperoleh dari hasil pengukuran ekspresi COX-2 pada sampel dideskripsi dengan *software Immunoratio*, dianalisis dengan uji ANOVA dan dilakukan analisis lebih lanjut dengan uji *Tukey* ($\alpha = 0.05$) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan dengan terapi

yang diberikan. Analisis statistik dengan menggunakan software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) 16.0. Gambaran histopatologi jaringan duodenum dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan kerusakan jaringan antar kelompok.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Histopatologi Duodenum Tikus Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) setelah Diterapi dengan Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L.)

Pengamatan Histologi jaringan merupakan salah satu parameter untuk mengetahui keberhasilan suatu terapi. Dengan metode pewarnaan Hematoksilin-Eosin (HE) gambaran histologi duodenum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) Model IBD dapat diamati dibawah mikroskop dengan melihat adanya perubahan yang terjadi pada jaringan duodenum. Tiap perlakuan dilakukan pengamatan berupa perubahan histologi yang terjadi meliputi perubahan pada mukosa berupa erosi epitel, hiperplasia sel goblet, dan adanya infiltrasi sel radang yang menandai terjadinya inflamasi.

Hasil penelitian dari pengaruh terapi ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L.) terhadap gambaran histopatologi duodenum Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dengan pewarnaan *hematoxylin eosin* (HE) menunjukkan adanya perbaikan pada struktur susunan epitel yang merata dan lebih teratur. Gambaran histologi duodenum pada masing-masing kelompok perlakuan ditampilkan pada Gambar 5.1 sampai dengan Gambar 5.5

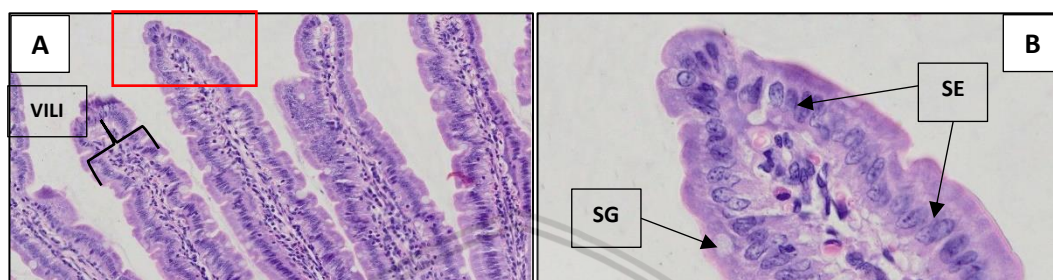
Gambaran histologi duodenum pada kelompok tikus kontrol/normal peresaran 100x (Gambar 5.1 A) menunjukkan struktur lapisan duodenum dan susunan epitel yang kompak, dimana memiliki vili panjang yang tersusun atas sel epitel silindris selapis yang teratur dan merata. Pada perbesaran 400x (Gambar 5.1B), kita dapat melihat susunan sel epitel yang rapi dan juga adanya sel goblet.

Hal ini sesuai penelitian Djumadi dkk (2008) yang menyatakan bahwa duodenum normal pada potongan melintang tersusun atas lapisan-lapisan (serosa, muskularis, submukosa, mukosa) teratur dan tampak struktur vili yang terdiri dari sel epitel selapis kolumnar tersusun kompak dengan inti bulat sampai oval.

Gambaran histologi duodenum pada kelompok tikus *inflammatory bowel disease* (IBD) perbesaran 100x (Gambar 5.2 A) menunjukkan terjadinya perubahan yang ditandai dengan struktur permukaan epitel yang kurang halus oleh adanya *space* intra-epitel, terjadi nekrosis, infiltrasi sel radang, dan vili duodenum mengalami erosi. Pada pembesaran 400x terlihat bahwasannya terdapat infiltrasi sel-sel radang dengan ditandai dengan munculnya sel neutrofil, limfosit, dan makrofag (Gambar 5.2 B) dan ada pula sel epitel yang mengalami nekrosis lequefaktif (Gambar 5.2 C). Hal tersebut sesuai dengan penelitian Kara (2012), bahwa induksi indometasin dengan dosis 15 mg/kg BB selama 24 jam menyebabkan terjadinya IBD yang ditandai dengan kongesti pembuluh darah, erosi epitel dan infiltrasi sel radang.

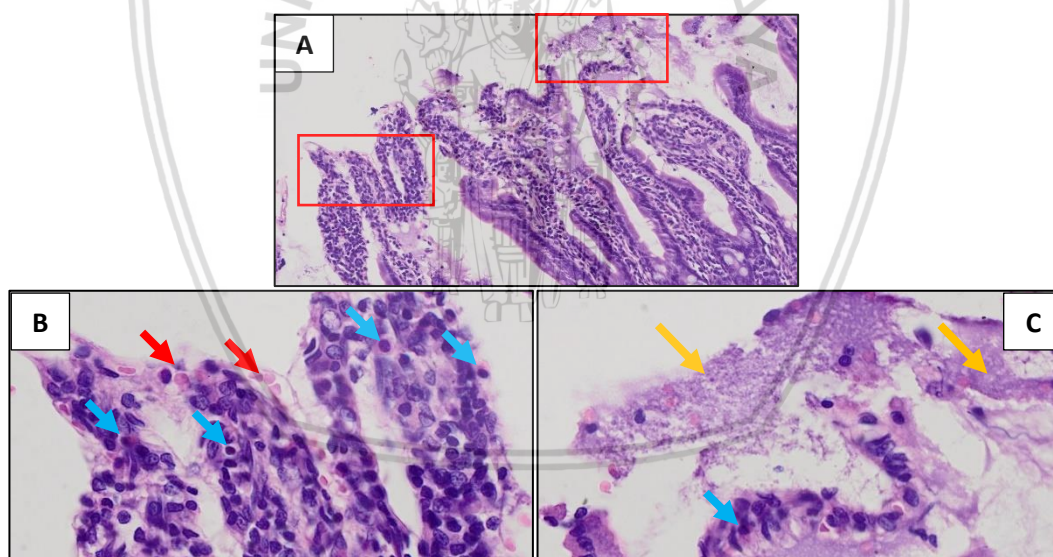
Inflamasi tersebut melibatkan sel inflamasi seperti neutrofil, limfosit, monosit dan makrofag, namun sel-sel radang yang mendominasi yaitu neutrofil. Hal tersebut dikarenakan pada fase awal proses peradangan, secara kimia sel yang pertama kali tertarik ke daerah inflamasi yaitu neutrofil. Neutrofil berperan dalam perbaikan mukosa. Satu jam setelah terjadi luka pada jaringan, neutrofil akan tertarik dan menjadi sel dominan pada jaringan yang luka selama dua hari pertama, dan jumlahnya akan meningkat pada hari kedua. Neutrofil akan memfagositosis sel debris dan membunuh bakteri, selain itu neutrofil juga akan mengeluarkan protease

untuk memecah jaringan yang rusak. Neutrofil dapat bertahan selama dua hari pada jaringan yang luka, selanjutnya neutrofil akan mengalami apoptosis dan di degradasi oleh makrofag (Martin and Leibovich, 2005).






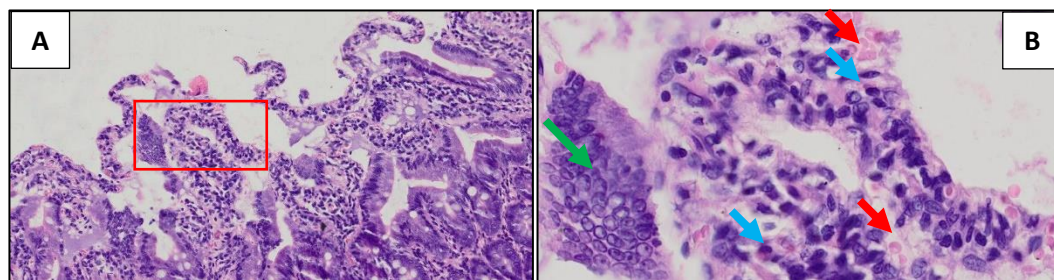
Gambar 5.1. Histologi vili organ duodenum tikus kontrol negatif/normal

Keterangan: (A) vili duodenum tikus kontrol/normal perbesaran 100x; (B) vili duodenum tikus perbesaran 400x, terdiri atas vili yang tersusun dari sel epitel columnar selapis (SE) dan sel goblet (SG).



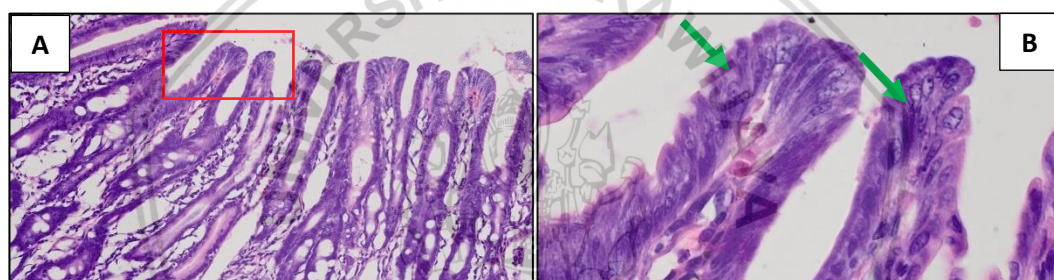
Gambar 5.2. Histopatologi vili organ duodenum tikus kontrol positif/IBD

Keterangan: (A) vili duodenum tikus IBD perbesaran 100x dengan struktur sel epitel pada vili mengalami radang dan terlihat mengalami nekrosis; (B) vili duodenum tikus perbesaran 400x, terlihat sel mengalami inflamasi ditandai dengan adanya sel-sel inflamasi () dan mengalami hemoragi (); (C) vili duodenum tikus perbesaran 400x yang nampak mengalami nekrosis liquefaktif ().



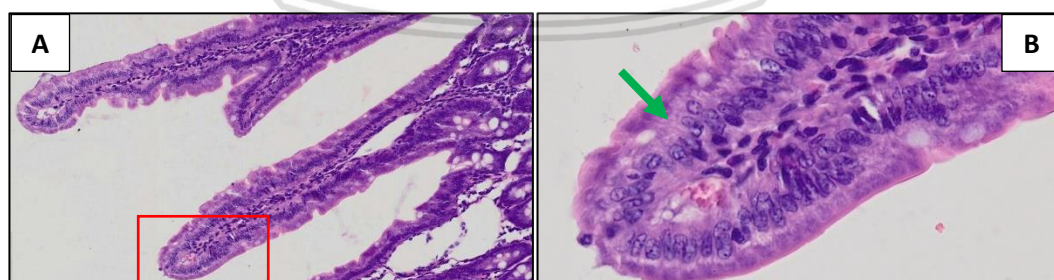
Gambar 5.3. Histopatologi vili organ duodenum tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja putih 500 mg/kg.

Keterangan: (A) vili duodenum tikus perbesaran 100x nampak masih terlihat adanya sel inflamasi dan ukuran vili duodenum memendek karena erosi sel; (B) vili duodenum tikus perbesaran 400x, masih terdapat jaringan yang mengalami inflamasi (↗) dan hemoragi (↗), namun, telah terlihat sel yang mengalami hiperplasia yang merupakan tanda dari regenerasi sel (↗).



Gambar 5.4. Histopatologi vili organ duodenum tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja putih 750 mg/kg.

Keterangan: (A) vili duodenum tikus perbesaran 100x yang sudah mulai menunjukkan perbaikan ditandai dengan vili yang memanjang namun lamina propia masih kosong; (B) vili duodenum tikus perbesaran 400x, nampak telah mengalami perbaikan terlihat dari sel epitel telah beregenerasi mengarah ke ujung vili (↗).



Gambar 5.5. Histopatologi vili organ duodenum tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja putih 1000 mg/kg.

Keterangan: (A) vili duodenum tikus perbesaran 100x; (B) vili duodenum tikus perbesaran 400x, terlihat sel-sel epitel pada vili yang mengalami regenerasi (↗) dan lamina propia mulai terisi oleh jaringan ikat.

Adanya stimulus baik eksogen maupun endogen yang menimbulkan inflamasi pada sel akan menyebabkan respon inflamasi yakni berupa reaksi kompleks pada jaringan yang mempunyai vaskularisasi. Inflamasi tersebut menyebabkan kerusakan permukaan mukosa duodenum dan pasokan oksigen yang mengangkut nutrisi menjadi berkurang (Kumar dkk, 2007). Pada saat terjadi rangsangan patologis baik berupa inflamasi atau kerusakan lainnya pada duodenum, kelenjar brunner yang terdapat pada lapisan submukosa akan lebih berperan dalam penyembuhan akibat rangsangan tersebut. Sel-sel mukus pada kelenjar brunner akan bertambah besar dan menghasilkan *epidermal growth factor* (EGF) yang tahan terhadap tripsin, kemotripsin dan pepsin. Cara kerja EGF yakni memodulasi sekresi asam lambung, menetralkan kerusakan jaringan dan mempengaruhi kecepatan proliferasi dalam kript duodenum (Macea *et al.*, 2006).

Pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja (*Plumeria acuminata*) mampu memperbaiki gambaran histopatologi duodenum tikus IBD. Gambaran histologi duodenum (Gambar 5.3 A) pada kelompok terapi ekstrak daun kamboja dosis 500 mg/kgBB menunjukkan sedikit perubahan yang ditandai dengan berkurangnya tingkat keparahan epitel duodenum yang terlihat dari ukuran vili yang masih pendek namun tidak mengalami nekrosis seperti yang terjadi pada tikus IBD. Pada perbesaran 400x (Gambar 5.3 B), terlihat bahwa telah terjadi penurunan dari jumlah infiltrasi sel radang serta sel epitel telah beregenerasi ditandai dengan adanya bentukan hiperplasia sel epitel. Gambaran histologi duodenum (Gambar 5.4 A) pada kelompok terapi ekstrak daun kamboja dosis 750 mg/kgBB menunjukkan perbaikan pada ukuran vili yang mulai memanjang, namun pada daerah lamina

propia masih belum terisi sempurna. Pada perbesaran 400x (Gambar 5.4 B) struktur permukaan epitel duodenum telah mengalami regenerasi yang terlihat dari bentukan sel epitel yang condong mengarah ke ujung vili. Hal ini menandakan bahwa sel epitel beregenerasi bergerak dari kriptus menuju ujung vili. Selain itu, temuan lain bisa kita dapatkan adanya penurunan dari infiltrasi sel radang. Gambaran histologi duodenum pada kelompok terapi ekstrak daun kamboja dosis 1000 mg/kgBB dengan perbesaran 100x (Gambar 5.5 A) menunjukkan perbaikan yang lebih baik dibandingkan kelompok terapi sebelumnya, hal ini ditunjukkan dengan struktur permukaan epitel lebih halus dan teratur serta bagian lamina propria telah terisi dengan jaringan ikat serta kapiler pembuluh darah. Pada perbesaran 400x (Gambar 5.5 B) telah terlihat struktur vili yang sudah mendekati kelompok normal. Perbaikan histologi duodenum tersebut disebabkan oleh adanya pengaruh dari antiinflamasi dan antioksidan dalam ekstrak daun kamboja.

Menurut Okamoto dan Watanabe (2004), vili duodenum memiliki sel-sel progenitor yang disebut stem sel atau sel induk duodenum. Sel induk ini terletak di dasar kelenjar intestinal (kriptus) dan merupakan sumber sel-sel lainnya, baik di dalam kriptus maupun pada vili. Sel induk ini akan bermitosis untuk mempertahankan populasinya dan untuk membentuk sel epitel kolumnar, sel goblet, sel paneth dan sel enteroendokrin. Perkembangan sel induk menjadi sel epitel kolumnar dimulai ketika sel induk yang bergerak dari kriptus menuju ujung vilus dalam waktu 3 sampai 6 hari dan kemudian dilepaskan. Sel epitel duodenum akan mengalami pembaharuan yang tidak terputus-putus dengan migrasinya sel induk dari dasar kriptus menuju vili.

Kandungan Lupeol asetat di dalam ekstrak metanol daun kamboja putih mampu meningkatkan kadar antioksidan endogen dalam tubuh dan sebagai antiinflamasi sehingga radikal bebas dalam tubuh seimbang. Antiinflamasi yang ditimbulkan oleh lupeol asetat dapat menekan produksi PGE₂, hal tersebut akan berpengaruh terhadap penurunan inflamasi sehingga mampu menekan terjadinya migrasi neutrofil ke jaringan (De Lima *et al.*, 2013). Berkurangnya migrasi neutrofil ke jaringan memberikan pengaruh terhadap rendahnya jumlah enzim proteolitik sehingga kerusakan sel dapat berkurang, selain itu, perbaikan sel juga didukung dengan adanya mekanisme regenerasi sel.

5.2. Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kamboja Putih (*Plumeria acuminata* L.) Terhadap Ekspresi *Cyclooxygenase-2* pada Hewan Model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) Hasil Induksi Indometasin

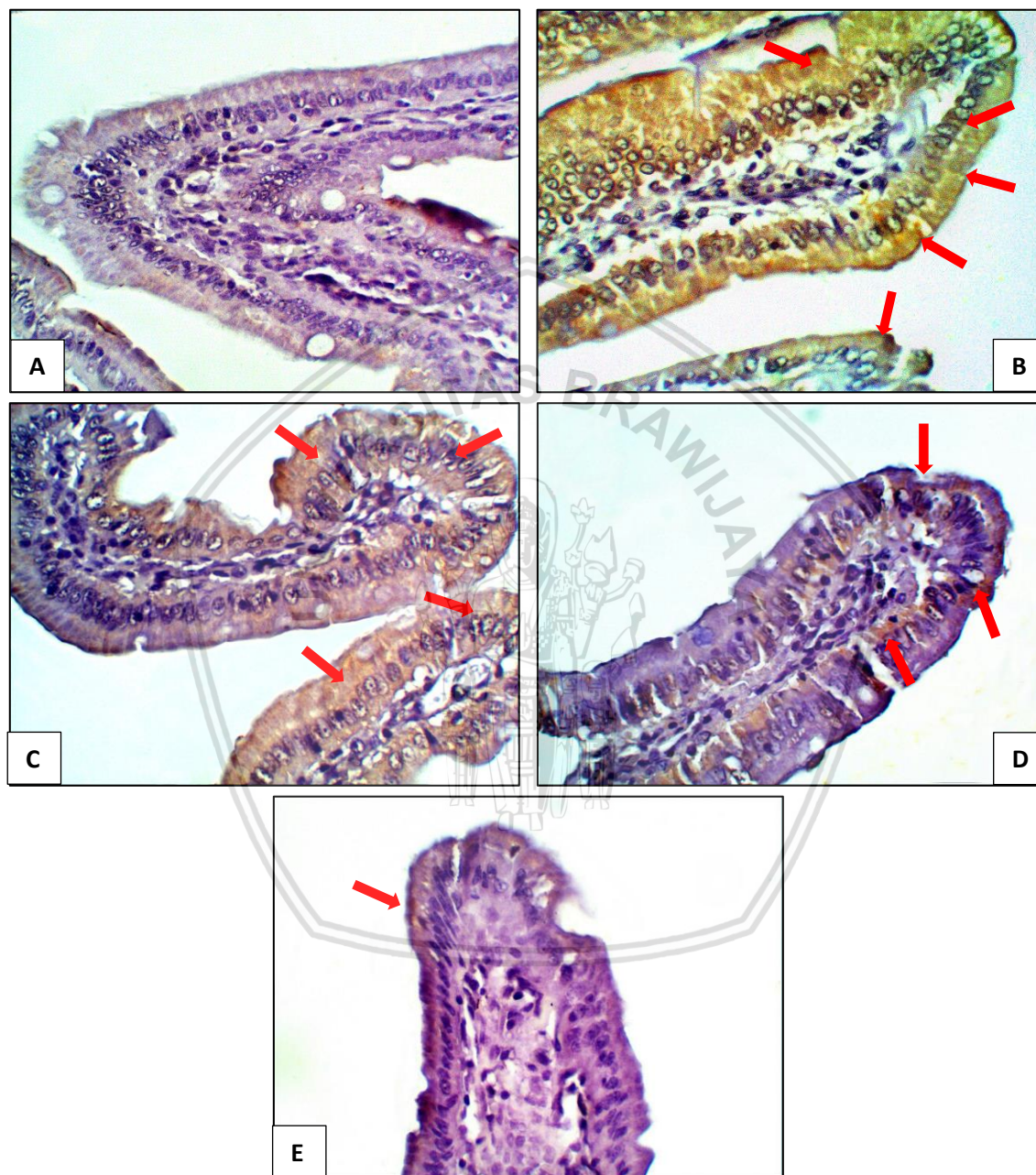
Pengaruh terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria accuminata* L.) terhadap ekspresi *Cyclooxygenase-2* (COX-2) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) yang diinduksi indometasin diamati menggunakan metode *Imunohistokimia* (IHK). *Imunohistokimia* adalah metode untuk mendeteksi keberadaan antigen spesifik di dalam suatu sel jaringan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi (Ab) dan antigen (Ag). Pengukuran ekspresi COX-2 menggunakan metode *imunohistokimia* dapat mengidentifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel, sehingga apabila terjadi peningkatan ekspresi COX-2 maka mengindikasikan adanya perubahan keadaan patologi dari suatu jaringan. Hasil pengamatan

menunjukkan adanya ekspresi COX-2 pada setiap perlakuan yang terlihat dengan munculnya warna coklat pada sitoplasma sel epitel duodenum, seperti yang ditunjukkan tanda panah merah pada **Gambar 5.6**.

Timbulnya warna coklat pada proses *Immuhistokimia* (IHK) dikarenakan adanya ikatan antara antigen dengan antibodi primer (*anti rat COX-2*) yang kemudian dilabeli oleh antibodi sekunder (*Goat Anti Rat biotin labeled*). Setelah terjadi ikatan dilakukan penambahan substrat *Diaminobenzidine* (DAB) yang berfungsi sebagai substrat kromogen, sehingga menghasilkan warna coklat pada jaringan Duodenum.

Cyclooxygenase-2 (COX-2) merupakan enzim penanda adanya inflamasi. Peningkatan ekspresi COX-2 mengindikasikan keadaan patologi suatu jaringan. Ekspresi COX-2 pada kelompok kontrol negatif ditunjukkan dengan intensitas rendah yang ditunjukkan dengan warna kecoklatan pada sitoplasma sel epitel duodenum (**Gambar 5.6.A**), pada tikus kelompok kontrol positif ekspresi COX-2 mengalami kenaikan intensitas warna coklat yang tersebar pada vili duodenum (**Gambar 5.6.B**). Ekspresi COX-2 pada setiap dosis terapi ekstrak metanol daun kamboja menunjukkan penurunan intensitas warna coklat yang terlihat pada kelompok tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja dosis 500 mg/kg BB (**Gambar 5.6.C**). Penurunan ekspresi COX-2 juga terjadi pada kelompok tikus dosis terapi 750 mg/kg BB (**Gambar 5.6.D**) dengan intensitas warna coklat yang lebih rendah dari pada kelompok tikus dosis terapi 500 mg/kg BB. Kelompok tikus yang menunjukkan penurunan

intensitas ekspresi COX-2 terendah terjadi pada kelompok tikus dosis terapi 1000 mg/kg (**Gambar 5.6.E**).



Gambar 5.6 Ekspresi *Cyclooxygenase-2* (COX-2) pada duodenum tikus perbesaran 400x.

Keterangan : (A) Tikus kontrol, (B) Tikus IBD, (C) Tikus terapi ekstrak metanol daun kamboja putih 500 mg/kg BB, (D) ekstrak metanol daun kamboja putih 750 mg/kg BB, (E) ekstrak metanol daun kamboja putih 1000 mg/kg BB. Tanda panah merah (➡) menunjukkan ekspresi COX-2.

Analisis kuantitatif ekspresi COX-2 dilakukan menggunakan program *software immunoratio* dengan menghitung persentase area ekspresi COX-2 pada lima lapang pandang. Hasil pengamatan *imunoratio* tersebut dilanjutkan dengan uji statistik *One Way ANOVA (Analysis Of Variance)* menggunakan SPSS 16 yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok perlakuan seperti yang disajikan pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Ekspresi COX-2 pada jaringan duodenum tikus (*Rattus norvegicus*) model IBD hasil induksi Indometasin yang diterapi ekstrak metanol daun kamboja putih.

Kelompok	Persentase Area Ekspresi COX-2 (%)	Area Ekspresi COX-2 (%)	
		Peningkatan	Penurunan
A (Kontrol)	15,6 \pm 2,2 ^a	-	-
B (IBD)	59,5 \pm 5,3 ^d	292,8	-
C (Terapi 500 mg/kg BB)	47,3 \pm 3,8 ^c	-	20,61
D (Terapi 750 mg/kg BB)	28,8 \pm 4,8 ^b	-	51,16
E (Terapi 1000 mg/kg BB)	18,7 \pm 2,3 ^a	-	68,62

Keterangan: Notasi a, b, c dan d menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Notasi yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan nyata antar perlakuan.

Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada kelompok A (kontrol negatif) dengan kelompok B (kontrol positif), terjadi peningkatan ekspresi COX-2 yang signifikan ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Kelompok C terjadi penurunan ekspresi COX-2 yang signifikan dan berbeda nyata dengan kelompok A dan B. Kelompok D terjadi penurunan COX-2 yang signifikan dan berbeda nyata dengan kelompok A, B, C dan E. Kelompok E tidak berbeda signifikan dengan kelompok A (kontrol negatif). Setelah uji ANOVA

dilakukan, data dianalisis dengan uji tukey. Hasil uji tukey menunjukkan bahwa kelompok E dengan dosis terapi ekstrak metanol daun kamboja putih 1000 mg/kg BB merupakan dosis yang memberikan perlakuan terbaik.

Pada kelompok perlakuan A (kontrol negatif) menunjukkan rata-rata ekspresi COX-2 sebesar $(0,156 \pm 0,022)$. Kelompok perlakuan B (IBD) yang diinduksi menggunakan indometasin menunjukkan rata-rata ekspresi COX-2 sebesar $(0,595 \pm 0,053)$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol negatif yang ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Ekspresi COX-2 tersebut mengalami peningkatan sebesar 292,8% apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini disebabkan karena pemberian indometasin 15 mg/kg BB secara peroral akan langsung menuju target yang dituju yaitu saluran pencernaan sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi pada saluran cerna sehingga dapat memicu munculnya COX-2 (Tanaka *et al.*, 2004).

Pada jaringan duodenum tikus kelompok C yang diterapi ekstrak methanol daun kamboja putih dengan dosis 500 mg/kg BB mampu menurunkan ekspresi COX-2 sebesar 20,47% $(0,473 \pm 0,038)$ pada kelompok D yang diterapi dosis 750 mg/kg BB mengalami penurunan ekspresi COX-2 lebih besar 51,16% $(0,288 \pm 0,048)$ dan tikus kelompok E yang diberikan terapi dosis 1000 mg/kg BB mengalami penurunan ekspresi paling besar 68,62% $(0,187 \pm 0,023)$ dari kelompok B (kontrol positif). Hal ini menunjukkan bahwa setiap terapi ekstrak metanol daun kamboja putih memiliki efek penurunan ekspresi COX-2 organ duodenum. Pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja putih dosis 1000 mg/kg BB merupakan dosis terbaik dalam menurunkan ekspresi COX-2 pada tikus ekstrak

metanol daun kamboja putih dari pada dosis 500 mg/kg BB dan dosis 750 mg/kg BB.

Penurunan presentase area ekspresi COX-2 terjadi karena kandungan lupeol asetat dalam ekstrak metanol daun kamboja putih dapat bertindak sebagai antiinflamasi. Pada Uji LCMS yang dilakukan, diketahui bahwa ekstrak metanol daun kamboja putih yang digunakan sebagai terapi terhadap tikus yang mengalami IBD terdapat kandungan *lupeol acetat* sebanyak 468 g/mol. Kandungan *lupeol acetat* tersebut merupakan kandungan yang paling banyak dibandingkan dengan senyawa *terpenoid* lainnya. *Lupeol acetat* merupakan turunan dari *Terpenoid*. Beberapa turunan *Terpenoid* yang berhasil teridentifikasi berdasarkan berat molekulnya adalah **(Lampiran 13)**:

- 1) Stigmast-7-enol: Molar mass 414 g/mol
- 2) Ursolic acid: Molar mass 456 g/mol
- 3) Lupeol acetat: Molar mass 468 g/mol
- 4) Lupeol carboxylic acid: Molar mass 426 g/mol

Lupeol Acetat yang terkandung dalam daun kamboja putih dapat bertindak sebagai antiinflamasi dengan cara menghambat enzim COX-2 sehingga prostaglandin tidak terbentuk. Kemampuan lupeol asetat dalam menghambat sitokin proinflamasi inilah yang dapat menyebabkan berkurangnya keparahan inflamasi sehingga kerusakan sel-sel pada duodenum dapat berkurang kemudian dapat memperbaiki gambaran histologi pada jaringan duodenum

BAB 6 PENUTUP

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

- 1 Pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) pada tikus model IBD dapat memperbaiki gambaran histopatologi sel epitel duodenum dan menurunkan infiltrasi sel radang.
- 2 Pemberian terapi ekstrak metanol daun kamboja putih (*Plumeria acuminata*) pada tikus model IBD dapat menurunkan persentase area ekspresi COX-2 pada kondisi IBD, yaitu dengan dosis terbaik ekstrak metanol daun kamboja putih adalah 1000 mg/kg BB sebesar 68,62%.

6.2. Saran

Diperlukan pengembangan mengenai pemanfaatan ekstrak daun kamboja putih (*Plumeria acuminata* L.) sebagai terapi terhadap penyakit *inflammatory bowel disease* (IBD) pada *pet animal*.

DAFTAR PUSTAKA

- Asni, E. 2009. *Pengaruh Hipoksia Berkelanjutan Terhadap Kadar Malondialdehid, Glutation Tereuksi, dan Aktivitas Katalase Ginjal Tikus*, *Majalah Kedokteran Indonesia*, 59(12): 595-600.
- Aulanni'am., A. Roosdiana, and N.L. Rahmah. 2012. *The Potency of Sargassum duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in Rattus norvegicus*. *Journal of Life Sciences* 6 : 144-154.
- Bekow, C.A and V. Baumans. 2003. *Common Non Surgical Techniques and Procedures*. In Hau J and Van Housier GL, editors *Handbook of Laboratory Animal Science*. CRC Press. 351-390.
- Bogdanske, John J., Scott Hubbard-Van Stelle, Margaret Rankin Rilry, Beth M. Schiffman. 2010. *Laboratory Rat Procedural Techniques Manual and DVD*. CPR Press Taylor and Francis Group. Florida p.67-68
- Bures J, J Pejchal, J Kvetina, A Tichý, S Rejchrt, M Kunes, M Kopacova. 2011. *Morphometric analysis of the porcine gastrointestinal tract in a 10-day high-dose indomethacin administration with or without probiotic bacteria Escherichia coli Nissle 1917*. *Hum Exp Toxicol*. Dec;30(12):1955-1962.
- Cheng, Jian and Xiao-Ming Fan. 2013. *Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development and progression*. *World J Gastroenterol*. 2013 Nov 14; 19(42): 7361–7368.
- Danastri, I Gusti Ayu Mahaprani dan Ida Bagus Darma Putra. 2011. *INFLAMMATORY BOWEL DISEASE*. Divisi Bedah Digestif/SMF Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Udayana.
- De Lima, F.O, V. Alves, J.M. Barbosa Filho, JR. Almeida, LC. Rodrigues, M.B. Soares, and C.F. Villarreal. 2013. *Antinociceptive Effect of Lupeol acetat: Evidence for a Role Cytokines Inhibition*. *Phytother. Res*.27:1557-1563.
- Devprakash, R. Tembore, S.Gurav, S.G.P.Kumar, T.M. Tamizh. 2011. *An Review Of Phytochemical Constituents & Pharmacological Activity Of Plumeria sp.*. *International Journal Of Current Pharmaceutical Reasearch*. Deptt of Pharmaceutical Chemistry, Bharathi college of pharmacy: India
- Eroschenko v. 2003. *diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations* ed 9 terjemahan. Tambayong J ed. Jakarta : EGC ; p.196-197
- Faiz, U, and D. Moffat. 2004. *At a glance series anatomi*. Rahmania A ed. Jakarta: Erlangga; p, 34-37

- Fawcett, D and B. William. 2002. A Textbook Of Histology ed 12 Terjemahan. Tambayong J ed. Jakarta: EGC ; p.552-569
- Furst, D.E., and R.W. Ulrich. 2007. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, & Drugs Used In Gout. In: Katzung, B.G., ed. *Basic and Clinical Pharmacology*. 10th ed. Singapore: The McGraw-Hill Company, 591-592.
- Hankenson, F. Claire. 2014. *Critical Care Management for Laboratory Mice and Rats*. CRC Press. p.113-115
- Gradel KO, HL. Nielsen, HC. Schonheyder, T. Ejlersen, B. Kristensen and H. Nielsen. 2009. *Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis.*; 137: 495-501[PMID: 19361507 DOI: 10.1053 j.gastro.2009.04.001].
- Gupta M, UK. Mazumder, P. Gomathi and V. Thamil. 2006. *Anti-inflammatory Evaluation Of Leaves Of Plumeria Acuminata*. BMC Complementary And Alternative Medicine; 1472-6882.
- Guyton, A, and E.H. John. 2007. Textbook of medical physiology ed 11 terjemahan. Setiawan I ed. Jakarta: EGC; p. 814-859
- Junquiera L.C, J. Carneiro and R.O. Kelley. 2003. *Basic Histology*. 10th edition, Washington, Lange: 316-23.
- Kathrani, A., D. Werling and K. Allenspach, 2011. *Canine breeds at high risk of developing inflammatory bowel disease in the south-eastern UK. Veterinary Record*. 169(24):635.
- Keenan JJ, CR. Beaugie, B. Jasmann, HC. Potter, JA. Collett and FA. Frizelle. *Helicobacter species in the human colon. Colorectal Dis* 2010; 12: 48-53 [PMID: 20050183 DOI: 10.1111/j.1463-1318.2008.01672.x].
- Klein, A. and R. Eliakim. 2010. *Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Inflammatory Bowel Disease. Departement of Gastroenterology. Rambam Health Care Campus, Haifa. Pharmaceuticals*. 3, 1084-1029;
- Konturek PC, J. Kania, JW. Konturek, A. Nikiforuk, SJ. Konturek and EG. Hahn. 2003. *H. pylori infection, atrophie gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PGE2 and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis*. Med Sci Monit. 9: SR53-60. Chem 276: 7614-7620.
- Kumar V, RS Cotran, dan SL Robbins. 2007. *Buku ajar patologi* .7 nd ed, Vol. 2.: Penerbit. Buku Kedokteran EGC. Jakarta

- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya
- Laudanno, O.M., L. Vasconcelos, J. Catalana, and J.A. Cesolari. 2006. *Anti-Inflammatory Effect of Bioflora Probiotic Administered Orally or Subcutaneously with Live or Dead Bacteria*. *Digestive Diseases Sciences*. 51:2180–2183.
- Li H, Edin ML, Bradbury JA, Graves JP, DeGraff LM, Gruzdev A, Cheng J, Dackor RT, Wang PM, Bortner CD, Garantziotis S, Jetten AM, Zeldin DC. 2013 *Cyclooxygenase-2 inhibits T helper cell type 9 differentiation during allergic lung inflammation via down-regulation of IL-17RB*. *Am J Respir Crit Care Med*. Apr 15;187(8):812-22.
- Lucetti, D.L., M.B. Anne, H.N. Veras, dan A.H. Silva. 2010. Anti-inflammatory Effect and Possible Mechanism of Action of Lupeol Acetate Isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *Journal of Inflammation*. Brazil: Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará.
- Macea, M. M. I., J. R. Macea dan Fregnani T. J. H. G. 2006. *Quantitative Study of Brunner's Glands in the Human Duodenal Submucosa*. *Int. J. Morphol*. 24(1):7-12.
- Martin, P and SJ, Leibovich. 2005. *Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly*. *Trends in Cell Biology* 15 (11): 599–607. doi:10.1016/j.tcb.2005.09.002.
- Matsui, H., O. Shimokawa., T. Kaneko., Y. Nagano., K. Rai, and I. Hyodo. 2011. *The pathophysiology of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced mucosal injuries in stomach and small intestine*. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* Vol. 48(2): 107–111.
- Mungle T., Suman T., Indu A., Bijan., Sanjit., Rosima., Sanjoy., Asok K.M., Chandan C. 2016. *Automated characterization and counting of ki-67 protein for breast cancer prognosis: a quantitative immunohistochemistry approach*. *Computer Methods and Program in Biomedicine*. 18:146-169
- Okamoto, R dan M. Watanabe. 2004. *Molecular and Clinical Basis Gastrointestinal Epithelia*. *J. Gastroenterol*, 39:1-6.
- Paiotti., RA, DA. Neto, SJ. Ribeiro. Miszputen and M, Franco. 2014. *The Role of COX-2 Inhibitor on Experimentl Colitis. Inflammatory Bowel Disease-Advance In Pathogenesis and Management*. Brasil.

- Pand RR and BN. Mehrotra. 2006. *Compendium of Indian Medicinal Plants*. Volume 2, CDRI, Lucknow & NISCAIR, New Delhi: 320-322.
- Rahardjani dan K. Budi. 2010. *Hubungan antara Malondialdehyde (MDA) dengan Hasil Luaran Sepsis Neonatorum*. *Jurnal Sari Pediatri*, 12(2): 82-87.
- Rajendran, R, S. Hemalatha, K. Akasakalai and R.M. Sundaran. 2010. *Hepatoprotective activity of Mimosa Pudica Leave extract againsts Carbontetrachloride Induced Toxicity*. *Jurnal of Natural Product*, (2);116-122.
- Rishi, A. 2017. *Anus and perianal area Inflammatory diseases: Crohn's disease*. Pathology Outlines Inc.
- Shinde P. R , PS. Patil and VA. Bairagi. 2014. *Phytopharmacological Review of Plumeria species*. *Sch. Acad. J. Pharm.*, 2014; 3(2): 217-227. ISSN 2320-4206.
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier-Saunders.p. United States of America.
- Sparkes H. 2010. *Long Term Use of NSAID in cats*. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 12, 521-538.
- Takeuchi K, A. Tanaka, S. Kato, K. Amagase and H. Satoh. 2010. *Roles of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage*. *Clin Chim Acta*; 411: 459-466
- Takeuchi, K. 2012. *Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: Importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility*. *World J Gastroenterol*. doi:10.3748/wjg.v18.i18.2147.
- Tanaka A, H. Araki, S. Hase, Y. Komoike and T. Koji. 2004. *Up-regulation of COX-2 by inhibition of COX-1 in the rat: a key to NSAID-induced gastric injury*. *Aliment Pharmacol Ther*; 16 Suppl 2: 90-101
- Tanaka A, H. Araki, Y. Komoike, S. Hase and T. Koji. 2005. *Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs*. *J Physiol Paris*; 95: 21-27.
- Tuominen, VJ., Ruotoistenmaki S., Viitanen A, Jumppanen M., Isola J. 2012. *Immunoratio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and ki-67 Breast cancer res*. 12(4):138-140

Wilmana, P.F. dan S.G. Gan. 2007. *Analgesik-Antipiretik Antiinflamasi Nonsteroid dan Obat Gangguan Sendi lainnya*. Dalam Gan, S.G., Editor. Farmakologi dan Terapi. Edisi 5.

